

**UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA
“FRUCTUOSO RODRÍGUEZ PÉREZ”**

**CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA
DIRECCIÓN DE SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**

***Relación entre la cupremia y los indicadores
reproductivos de la hembra bovina.***

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias.



Autor: Dr Mv Juan Ramón García Díaz.

**La Habana
2008**

**UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA
“FRUCTUOSO RODRÍGUEZ PÉREZ”**

**CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA
DIRECCIÓN DE SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**

***Relación entre la cupremia y los indicadores
reproductivos de la hembra bovina.***

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias.

Autor: Dr Mv Juan Ramón García Díaz.

**Tutores: Dr C José Miguel Figueredo Ross.
Dr C Mario Cuesta Mazorra.**

**La Habana
2008**

Dedicatoria.

A mis hijos Juan Luís, Ernesto, Dianelis y Dainelis, que son las personas más importantes en mi vida, mi razón de ser y fuente de inspiración; espero que el esfuerzo realizado para desarrollar este trabajo sirva de ejemplo en sus vidas futuras.

A mis padres que han sido un ejemplo a imitar y me han guiado por el camino correcto. A mis hermanos por todo el apoyo moral que me han brindado en estos tiempos difíciles de mi vida.

A mi esposa por el apoyo brindado, pero sobre todo por su paciencia y comprensión, por haberle quitado tiempo y atenciones que merece.

A los que murieron por nosotros e hicieron posible la hermosa obra de la revolución cubana que ha permitido mi desarrollo profesional.

A todos aquellos que de forma desinteresada hicieron posible este trabajo.

Agradecimientos.

A mis tutores, maestros y amigos Dr C José Miguel Figueredo Ross y Mario Cuesta Mazorra, por aceptarme como alumno, diseñar y criticar de manera constructiva este trabajo, dedicado parte de su valioso tiempo, haberme brindado todo su apoyo y compartir conmigo sus ideas.

A los Dr C Roberto Faure García, Rodolfo Pedroso Sosa y Mario Reinoso Pérez, también al ing M Sc Reinaldo Quiñónez Ramos, por toda la ayuda brindada, sus comentarios constructivos y apoyo incondicional en la realización de este trabajo, para el cual siempre mostraron un interés especial.

Al técnico Ángel Mollineda Trujillo del centro de investigaciones agropecuarias (CIAP), por todo el tiempo que dedicó en el procesamiento de todas las muestras de suelo, pasto, suero sanguíneo, hígado y leche; labor que realizó de manera profesional, entusiasta y desinteresada.

Al Dr C Pastor Alfonso Zamora por haberme abierto las puertas del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) y brindado todo su apoyo de manera incondicional.

Al Dr C Jesús Rodríguez Diego por la amabilidad y la atención esmerada que siempre me dedicó.

A mis compañeros Dr C Alcides Pérez Bello, M Sc Rafael Sosa Martínez e ing Yanetsy González Ruíz por su colaboración en el procesamiento estadístico de los resultados.

A los Dr C Octavio Fernández Limia, Félix Agüero Díaz, Evangelina Marrero Faz, Maria Antonia Aveledo García, Maria Irian Percedo, Carlos Anibal Bulnes, Luz Maria Sánchez y Arturo Escobar, de la Dirección de Salud y Producción Animal del CENSA, por sus sabios consejos y oportunos señalamientos que me permitieron culminar el trabajo.

A mis compañeros de trabajo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UCLV, Dr C Miguel Herrera Suárez, Miguel Rodríguez Orozco, Miguel Hernández Barreto, Leonel Lazo

Pérez, Ramón García Herrera y Luís Antonio Barranco Olivera; a los MSc Pedro de la fe Rodríguez, Ernesto Noval Artilles, Silvino Vargas Hernández, Marisol Gutiérrez Parra y Miguel A Arce González; a la secretaria Carmen Mendoza Veitía por todo el apoyo brindado, gran profesionalismo y responsabilidad.

A los especialistas de suelo de esta institución, Dr C Pedro Cairo Cairo, Joaquín Machado de Armas y Pedro Torres Artilles por el trabajo realizado y sus oportunas recomendaciones.

A los compañeros del laboratorio clínico del hospital Militar “Comandante Manuel Fajardo” de Santa Clara; Ing Carmen Acosta, Lic Milagros Gómez y Gladis Abreu por su contribución en la realización de las determinaciones enzimáticas.

A los compañeros del Instituto de Ganadería Tropical (IGAT), Dr C Felicia Roller Gutiérrez; técnico Noel Felipe Sosa y Mercedes Martínez.

A los dirigentes de la Empresa Pecuaria La Vitrina; ingenieros Gerardo Moya García y Jorge Luís González Valdés; sus especialistas en reproducción, Dr Mv Elio Núñez Ruiz, técnicos Luís Hernández, José García Morfi y Quintín Pedraza Sánchez y a sus obreros José Domingo Garcés, Yosvany Pérez Domínguez, Armando González Pestano, Danilo Ruiz Trimiño, Luís León Redondo, por el apoyo incondicional, la seriedad y entusiasmo mostrado en la realización de este trabajo.

A todos aquellos que de forma incondicional brindaron su ayuda.

SÍNTESIS

Se realizaron 4 experimentos con el objetivo de determinar la relación entre los valores de la cupremia y los indicadores reproductivos de la hembra bovina y el efecto de la suplementación del Cu sobre el comportamiento reproductivo en animales hipo y normocuprémicos; que comprendieron estudios sobre la composición mineral del suelo, pasto, suero sanguíneo y reservas hepáticas de los animales, los efectos tóxicos y residuales de diferentes concentraciones de cobre, la relación entre la cupremia y los indicadores reproductivos y el efecto de la suplementación cúprica sobre el comportamiento reproductivo de novillas y vacas con diferentes niveles de cupremia; realizándose la evaluación económica del tratamiento. Se comprobó la deficiencia de Cu en la totalidad de las muestras de suelo y pasto, en el 75% de las de suero sanguíneo y en el 72% de las de hígado; con una disminución del comportamiento reproductivo de estos rebaños. La administración de diferentes concentraciones de Cu por vía parenteral (50 y 100 mg) y (50, 100 y 200 mg) son capaces de incrementar ($p < 0.05$) los niveles de Cu en suero sanguíneo y tejido hepático respectivamente en los animales tratados, sin presentar efectos tóxicos ni residuales. Se demostró que la hipocupremia aumenta 4.93, 2.52 y 3.33 veces el riesgo de presentar anestro, repetición de servicio y los problemas reproductivos totales respectivamente; encontrándose que los niveles de Cu séricos están altamente correlacionados con los indicadores reproductivos. La administración de 50 mg de Cu por vía parenteral en vacas y novillas hipocuprémicas y cíclicas incrementó ($p < 0.001$) la cupremia y ($p < 0.01$) los porcentajes de presentaciones de celo y gestaciones; disminuyendo el riesgo relativo de presentar trastornos reproductivos en los animales tratados. Esta terapéutica, en los animales hipocuprémicos anéstricos incrementó la cupremia ($p < 0.001$) en las novillas y ($p < 0.01$) en las vacas; la combinación de esta con los tratamientos de inducción del celo aumentaron ($p < 0.01$) los porcentajes de presentaciones de celo y gestaciones en las novillas y ($p < 0.05$) las proporciones de concepción en las vacas. El tratamiento también resultó eficaz en los animales normocuprémicos, incrementando ($p < 0.0001$) los valores del cobre en suero sanguíneo, ($p < 0.01$) la presentaciones de celo y ($p < 0.001$) las proporciones de concepción, especialmente en animales con valores de cupremia inferiores a $14 \mu\text{mol/L}$; nivel a partir del cual no se apreciaron diferencias entre los grupos tratados y controles. Se demostró preliminarmente la factibilidad económica de la cuproterapéutica empleada, recomendándose ejecutar un estudio multicéntrico que permita corroborar los resultados obtenidos en el presente trabajo y realizar un análisis completo del costo beneficio, y evaluar su utilidad en otras categorías bovinas y especies animales de interés.

Siglas y abreviaturas utilizadas.

AGL: Ácidos grasos libres

a.m: Ante meridiano

AOAC: Association Official of Analytical Chemists

ATP: Adenosin trifosfato

BEN: Balance energético negativo

cmol/kg⁻¹: centimol por kilogramo

Cp: Ceruloplasmina

CuS: Sulfuro de cobre

CuSO₄: Sulfato de cobre

DE: Desviación estándar

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

EE: Error estándar

EM: Energía Metabolizable

FeS: Sulfuro de hierro

FSH: Hormona foliculo-estimulante

GnRH: Hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas

IC: Intervalo de confianza

ISO: International Organization Of Standard

K₂O: Potasio disponible del suelo

LC: Límite crítico

LH: Hormona luteinizante

LN: Latitud Norte

LW: Longitud Oeste

mEq/100g: Miliequivalentes por 100 gramos de suelo

mg/100g: miligramos por 100

MINAG: Ministerio de la Agricultura

mmol/L: milimol por Litro

MO: Materia orgánica

MS: Materia seca

msnm: metros sobre el nivel del mar

MT: Metalotioneína

NRC: National Research Council

OPS: Organización Panamericana de la Salud

P₂O₅: Fósforo disponible del suelo

PDIE: Proteína degradable en intestino

PDIN: Proteínas no degradable en rumen

ppm: Partes por millón

r: Coeficiente de correlación

SOD: Superóxido dismutasa

μmol/L: Micromol por Litro

INDICE

<i>Introducción</i>	1
<i>Capítulo 1: Revisión bibliográfica.</i>	6
1.1: Importancia y control de la eficiencia reproductiva.	6
1.2: Indicadores más comunes de la eficiencia reproductiva y sus valores óptimos.	6
1.3: Principales factores que afectan la eficiencia reproductiva del rebaño.	7
1.3.1 Deficiencias de proteínas y energía.....	8
1.3.2: Condición corporal	9
1.3.4: Deficiencias de la nutrición mineral.	10
1.4: Diagnóstico bioquímico de las enfermedades metabólicas y carenciales.	10
1.5: Incidencia de la deficiencia de Cu en el mundo y en Cuba.	11
1.6: Relación de la hipocuprosis con los trastornos reproductivos.	12
1.7: Otras manifestaciones carenciales asociadas a la hipocuprosis.	14
1.8: Importancia del Cu para el organismo.	17
1.9: Metabolismo del Cu.	19
1.9.1: Absorción del Cu.	19
1.9.2: Elementos antagonistas de la absorción del Cu.	20
1.9.3: Transporte y almacenamiento.	21
1.9.4: Excreción del Cu.....	22
1.9.5: Transferencia del Cu al feto durante la gestación.	23
1.10: Etiología de la deficiencia de Cu.	23
1.11: Requerimientos de Cu en la especie bovina.	24
1.12: Diagnóstico y caracterización de la hipocuprosis.	24
1.12.1: Concentraciones sanguíneas de Cu.....	25
1.12.2: Concentraciones de Cu en tejido hepático	26
1.12.3: Determinación de sustancias con Cu en su molécula.....	26
1.13: Niveles e interrelaciones de dicho elemento en el suelo y el pasto.	27
1.13.1: Suelo.	27
1.13.2: Forrajes.	28
1.14: Suplementación del Cu por vía oral y su repercusión sobre aspectos bioproductivos.	28
1.15: Ventajas de la suplementación con sales inyectables de Cu.	31
1.16: Intoxicación con Cu en bovinos.	32
1.16.1: Intoxicación Aguda.....	32
1.16.2: Intoxicación crónica.....	34
<i>Capítulo 2: Parte experimental.</i>	35
2.1: Materiales y métodos generales.	35
2.1.1: Unidades donde se desarrolló la investigación.	35
2.1.2: Clima del área experimental.	35
2.1.3: Animales utilizados.....	35
2.1.4: Sacrificio de los animales.	36
2.1.5: Sistema de pastoreo y de ordeño.....	36
2.1.6: Alimentación.....	36
2.1.7: Producto empleado y forma de administración.....	36

2.1.8: Toma de muestras.....	37
2.1.9: Técnicas y procedimientos utilizados.....	37
2.1.10: Criterios de inclusión y exclusión.....	40
2.1.11: Valoración económica preliminar.....	40
2.1.12: Procesamiento de los resultados.....	40
2.2: Experimento 1: Caracterización de la deficiencia de Cu y los indicadores reproductivos del bovino lechero en la zona centro sur de la provincia villa clara.....	41
2.2.1: Introducción.....	41
2.2.2: Materiales y Métodos.....	41
2.2.3: Resultados y discusión.....	45
2.2.4: Conclusiones.....	53
Experimento 2: Efecto de la aplicación parenteral de diferentes dosis de Cu sobre la dinámica de las concentraciones séricas y hepáticas, actividad enzimática y la residualidad en leche. 54	
2.3.1: Introducción.....	54
2.3.2: Materiales y Métodos.....	54
2.3.3: Resultados y Discusión.....	56
2.3.4: Conclusiones.....	64
2.4: Experimento 3: Estudio de la relación entre los valores de la cupremia y los indicadores reproductivos de la hembra bovina.....	65
2.4.1: Introducción.....	65
2.4.2: Materiales y Métodos.....	65
2.4.3: Resultados y Discusión.....	67
2.4.4: Conclusiones.....	77
2.5: Experimento 4: Confirmación del efecto de la suplementación del Cu por vía parenteral sobre el comportamiento reproductivo en hembras bovinas ciclicas y anéstricas con diferentes valores de cupremia.....	78
2.5.1: Introducción.....	78
2.5.2: Materiales y Métodos.....	78
2.5.3: Resultados y Discusión.....	80
2.4.4: Conclusiones.....	88
Capítulo 3: Criterios preliminares para la valoración económica.....	89
3.1: Bases para su análisis.....	89
3.2: Costo de las materias primas del tratamiento anual por vía parenteral para cada animal.....	89
3.3: Costo de oportunidad de la no aplicación del tratamiento con cobre por vía parenteral.....	90
3.4: Impacto económico del tratamiento.....	90
3.4 Conclusiones.....	93
Capítulo 4: Discusión general.....	94

<i>Conclusión general</i>	99
<i>Recomendaciones generales</i>	99
<i>Aportes o novedades de la tesis</i>	100
<i>Referencias bibliográficas</i>	102
<i>Anexos</i>	137

Introducción.

La rentabilidad y la eficiencia en la ganadería bovina, depende fundamentalmente de las capacidades reproductivas de los animales, la salud y el incremento de la productividad por área en explotación. Un parto al año por hembra incorporada a la reproducción, garantiza una lactancia y al menos, una cría para el autoreemplazo de la masa.

La pérdida de un ciclo estral, disminuye el potencial productivo y reproductivo del animal; lo que representa la pérdida potencial de una cría cada 13 ciclos estrales y la disminución de la producción láctea entre 100 y 300 litros de leche por ciclo (Holy, 1987; Howard *et al.*, 2001); deduciéndose que el incremento del periodo interpartal, atenta contra la eficiencia y la productividad del rebaño al provocar disminución del número de crías y lactancias durante la vida útil del animal.

Estudios realizados en países desarrollados para evaluar las consecuencias económicas del incremento del periodo interpartal, demostraron que valores superiores a 365 días en este indicador, se traduce en una pérdida de \$1.00 dólar/vaca/día; y se incrementan a \$3.00 dólares/vaca/día con intervalos parto-parto superiores a 395 días (Grant y Keown, 1997). Se estiman pérdidas entre \$ 2.00 y 4.00 dólares/día cuando el indicador es mayor a 12.5 meses (Forero, 2000).

En Cuba en la década de los años 90, con las limitaciones del periodo especial, hubo una disminución significativa de la eficiencia de la reproducción animal y decrecieron cualitativa y cuantitativamente los resultados de la inseminación artificial; pero a partir del año 2000 y hasta el 2005 se observó una mejoría en la fertilidad y natalidad de nuestros rebaños ganaderos (MINAG, 2005). Sin embargo, aún estamos lejos de lograr la máxima eficiencia reproductiva; influyendo negativamente sobre ella factores de manejo reproductivo, fisiológicos, genéticos, climáticos y de calidad seminal. No obstante, el principal factor limitante del desempeño reproductivo de nuestras hembras bovinas lo constituye la alimentación deficiente y dentro de ellas las deficiencias minerales (Alfonso *et al.*, 2007).

La deficiencia de Cu o hipocuprosis es una de las carencias minerales que mayor influencia tiene sobre el desempeño reproductivo (Córdova *et al.*, 2002); se considera la segunda más frecuente en bovinos en pastoreo en el mundo después de la de fósforo (Pavlata *et al.*, 2005) y en ella juega un papel preponderante los niveles e interrelaciones de dicho elemento en el suelo y el pasto (Kalmbacher *et al.*, 2005).

En Cuba, esta carencia se diagnosticó en el 77% del ganado bovino (Pedroso, 2005), esta situación coincide con la reportada en Empresas Pecuarias de la región central de nuestro país, donde se

diagnosticaron altas proporciones de vacas, novillas y sementales vacunos con hipocupremia, que estaba afectando la reproducción y la producción láctea (García *et al.*, 2005). Sin embargo, el contenido de Cu en el suelo no ha sido evaluado y los estudios sobre sus concentraciones en el pasto, son escasos, la mayoría de ellos desarrollados en los años 80. Es necesario realizar un estudio integral de las concentraciones de Cu en el eje suelo-planta-animal para conocer la magnitud real de esta carencia y en estos últimos incluir en el diagnóstico no solo la determinación de las concentraciones de Cu en suero sanguíneo, sino también medir el contenido de este microelemento en el tejido hepático, por ser el hígado el órgano de reserva y verdadero indicador del estado del Cu en el organismo (Bouda *et al.*, 2005).

Son varias las manifestaciones clínicas asociadas a la hipocuprosis, entre ellas: anemia, claudicación, diarrea, crisis hemolíticas, úlceras abomasales, poliencfalomalacia, muerte súbita (Radostits *et al.*, 2000), predisposición a enfermedades infecciosas (Kozak *et al.*, 2003) y mala condición corporal (Cuesta *et al.*, 2003), aunque se ha señalado a los problemas reproductivos como la principal manifestación carencial de la hipocuprosis en animales adultos (Kendall *et al.*, 2003)

Se ha sugerido que la hipocuprosis se encuentra asociada con trastornos funcionales reproductivos, retardo en la involución del útero, abortos, repetición del celo y retardo en la aparición de la pubertad, aunque no se han identificado con exactitud los mecanismos de acción (Pedroso, 2004). Esta asociación ha sido establecida durante años y en condiciones de producción sobre la base de la observación de deficiencias reproductivas en rebaños que han presentado varias alteraciones metabólicas y nutricionales, entre ellas la carencia de Cu, reflejadas en el estudio de sus perfiles metabólicos o bien en condiciones controladas, donde se ha inducido el estado carencial, observándose posteriormente los desordenes reproductivos; sin embargo, no se conoce el grado de relación entre la cupremia y los indicadores reproductivos de la hembra bovina lechera, ni en que niveles de la misma se establece dicha asociación. Además la deficiencia de Cu como factor de riesgo de los trastornos reproductivos no ha sido evaluada en rebaños comerciales, por lo que se hace necesario realizar los estudios correspondientes para esclarecer estos aspectos.

Ya desde muy temprano se demostró que la administración de Cu indujo la ovulación en los conejos (Suzuki y Bialy, 1964); mas recientemente, la administración de GnRH en ratas con tenores normales de Cu, aumentó la liberación de LH y FSH hipofisiarias, en comparación con las hipocuprémicas (Kochman *et al.*, 1992); posiblemente el Cu estimula los receptores de GnRH en la

hipófisis facilitando su acción. (Kochman *et al.*, 1997). La suplementación mineral corregida en áreas de producción ha repercutido favorablemente sobre los aspectos biológicos, indicadores reproductivos, productivos y económicos del ganado, utilizándose con este fin diferentes mezclas de Cu por vía oral para las hembras bovinas lecheras (Muehlenbein *et al.*, 2001). Esta vía tiene varios inconvenientes entre los que se encuentran, en primer lugar la gran cantidad de antagonistas que interfieren su absorción y metabolismo, además con esta forma de administración no se controla el consumo del mineral por los animales y como consecuencia de estos dos factores puede presentarse la carencia en los mismos, aun cuando le ofertemos sales minerales enriquecidas con Cu (Knowles *et al.*, 2000).

Los medicamentos aplicados parenteralmente suelen ser de elección porque permiten garantizar un suministro adecuado del microelemento para cada animal, no son costosos y al compararlos con la suplementación oral poseen practicidad de manejo y evitan las interferencias a nivel digestivo (Costa *et al.*, 1999, 2003); pueden ser administrados en el momento preciso o de mayores demandas de los animales como por ejemplo durante el último tercio de la gestación y en épocas de sequías; no producen daño en el lugar de aplicación, tienen un satisfactorio almacenamiento hepático de la dosis administrada y margen de seguridad aceptable entre la dosis terapéutica y la dosis tóxica (Radostits *et al.*, 2000).

Para prevenir y curar la hipocuprosis en las zonas ganaderas afectadas se han introducido en el mercado diferentes fármacos inyectables de Cu, el tratamiento de esta carencia en terneros con Cu parenteral ha aumentado la cupremia, las ganancias de peso diarias y los pesos al destete (Viejo y Casaro, 1993); también, se ha comprobado bajo condiciones experimentales, que esta terapéutica logra mantener una reserva hepática de Cu elevada durante un período prolongado (Minatel *et al.*, 1998).

En novillas de primer servicio, el tratamiento con Cu inyectable aumentó el índice de gestaciones al compararlo con respecto a las testigos (Ricciardino *et al.*, 1998); con esta terapéutica se ha logrado una disminución de los servicios por concepción de 2.5 a 1.7 (Mackenzie *et al.*, 2001). Posteriormente en vacas suplementadas con Cu por vía parenteral se observaron mayores números de celos, mejores tasas de servicio por concepción y elevación en los porcentajes de preñez (Brem *et al.*, 2002).

En el ganado bovino lechero la administración parenteral de Cu redujo los intervalos parto-primer servicios, parto-concepción e intervalo parto-parto (Walter y Marro, 2003; Black y French, 2004),

no obstante los resultados expuestos anteriormente, se desconoce la influencia que pudiera tener la suplementación del Cu por vía parenteral sobre el comportamiento reproductivo en animales normocuprémicos, el nivel óptimo de cupremia para que las hembras bovinas puedan manifestar una adecuada eficiencia reproductiva y los límites crítico para obtener una respuesta beneficiosa con la suplementación cúprica, que indiquen los valores de Cu séricos hasta donde se debe suplementar este mineral en la especie bovina en nuestras condiciones; tampoco ha sido evaluado el nivel de protección que brinda el tratamiento con Cu inyectable para los trastornos reproductivos. Estas consideraciones hacen necesaria la realización del estudio dirigido a puntualizar estos aspectos para maximizar la eficacia de los tratamientos de esta enfermedad carencial.

Por ello **la hipótesis** en que se sustenta este trabajo es la siguiente:

Existe una relación entre los niveles de Cu séricos y los indicadores reproductivos de la hembra bovina en determinado rango de cupremia que permite emplear la suplementación cúprica por vía parenteral en animales considerados hipo y normocuprémicos con eficacia sobre el comportamiento reproductivo.

Objetivo general:

Determinar la relación entre los valores de la cupremia y los indicadores reproductivos de la hembra bovina y el efecto de la suplementación parenteral del Cu sobre el comportamiento reproductivo en animales hipo y normocuprémicos.

Objetivos específicos.

1. Evaluar el contenido de Cu en suelo, pastos, suero sanguíneo y tejido hepático de las hembras bovinas lecheras y los indicadores reproductivos en vaquerías de la zona centro sur de la provincia Villa Clara.
2. Determinar la dosis parenteral de Cu que restablezca las concentraciones séricas y hepáticas en animales hipocuprémicos sin provocar efectos tóxicos sobre el hígado ni residualidad en la leche.

3. Demostrar si existe correlación entre los valores de la cupremia y los indicadores reproductivos de las hembras bovinas con cupremia espontánea e inducida.
4. Determinar la influencia de la aplicación parenteral de la dosis mínima eficaz de Cu sobre el comportamiento reproductivo de las hembras bovinas cíclicas y anéstricas, tanto hipo como normocupremicas.

Capítulo 1: Revisión bibliográfica.

1.1: Importancia y control de la eficiencia reproductiva.

El mantenimiento de una alta eficiencia reproductiva en el manejo del rebaño lechero es indispensable para alcanzar su rentabilidad en el corto y mediano plazo. Una buena eficiencia reproductiva permite incrementar la producción de leche por día de vida rebaño, aumentar el número de terneros por vaca, disminuir los costos asociados con el mantenimiento de vacas secas, los costos de la inseminación artificial (IA) y el descarte de vacas por fallas reproductivas. Además, incrementa la tasa de ganancia genética al permitir descartar vacas por baja producción en vez de hacerlo por problemas reproductivos (Wattiaux, 1996).

Para evaluar la eficiencia reproductiva, en la producción lechera, se utilizan un grupo de indicadores que reflejan la eficacia del manejo, la alimentación y los programas de IA, el análisis e interpretación de los mismos permite diagnosticar la situación reproductiva y es la base para la toma de decisiones relativas y aplicar las medidas correctivas para solucionar los problemas identificados, además pronostican sobre bases científicas, el futuro desempeño reproductivo y productivo de los rebaños objeto de estudio. (Blanco, 1998).

La primera valoración que debe efectuarse es la del estado reproductivo del rebaño, que aprecia el resultado final del proceso reproductivo, es decir evalúa en buena medida la eficacia de las acciones desarrolladas en la alimentación, manejo reproductivo y la asistencia veterinaria, unido a los principales indicadores. Un rebaño eficiente debe poseer más del 50 % de las vacas gestantes, el 25 % inseminadas, el 20 % recentinas y menos del 5 % de vacías (Grant y Keown, 1997; Blanco, 2000).

1.2: Indicadores más comunes de la eficiencia reproductiva y sus valores óptimos.

Existen numerosos parámetros que al considerar aspectos parciales del ciclo reproductivo de la vaca, permiten evaluar el desempeño reproductivo del conjunto, debiéndose utilizar los más eficaces y de menor complejidad para su obtención o cálculo (Visentini, 2000)

A nivel mundial se postulan y publican los listados de los índices reproductivos más comunes (tabla 1.2.1) y sus valores óptimos, en muchas ocasiones sobre bases ideales, pues muchas veces constituyen objetivos o aspiraciones que deben ser atemperadas a las realidades concretas de las razas, región geográfica, sistema de explotación, clima, época del año, entre otros factores; entre los indicadores más usados se encuentran: el intervalo parto-parto (IPP), el intervalo parto-primer

servicio (IPPS), el intervalo parto-gestación (IPG) o período de servicio (PS), los servicios por gestación o índice de inseminación artificial y el porcentaje de gestación al primer servicio (Blanco, 2000).

Tabla 1.2.1 Índices reproductivos más comunes y sus valores óptimos bajo condiciones ideales (Wattiaux, 1996).

Índice reproductivo.	Valor optimo.	Valor con problema.
Promedio de días al primer celo observado.	< 40 días.	>60 días.
Intervalo parto primer servicio.	45 - 60 días.	>60 días.
Días abiertos o período parto-concepción.	85-110 días.	>140 días.
Intervalo entre partos.	12.5 - 13 meses.	> 14 meses.
Servicios por concepción.	< 1.7.	>2.5.
Índice de concepción al 1er servicio en novillas.	65 - 70%.	<60%.
Índice de concepción al 1er servicio en vacas.	50 - 60%.	<40%.
Vacas que conciben con menos de 3 servicios.	>90%.	<90%.
Vacas vacías o abiertas por más de 120 días.	<10%.	>15%.
Duración del período seco.	50 - 60 días.	<45 o >70 días.
Promedio de edad al primer parto.	24 meses.	<24 o >30 meses.
Porcentaje de abortos.	<5%.	>10%.
Porcentaje de eliminación por infertilidad.	<10%.	>10%.

Se ha sugerido el uso de otros índices reproductivos tales como: producción de leche por día de intervalo entre partos, índice de fertilidad, porcentaje de eliminación de vacas por problemas reproductivos e índice de no retorno (Gallego, 1998). Aunque se resumieron los indicadores más usados en el mundo, no significa que se presentaran en su totalidad, ni que todos deban ser usados al hacer la evaluación de la eficiencia reproductiva de un rebaño (Blanco, 2000).

1.3: Principales factores que afectan la eficiencia reproductiva del rebaño.

La vaca productora de leche es el organismo más eficiente en la producción de nutrientes para el hombre; es, entre los rumiantes, la que muestra mayor tasa de síntesis de producto y sobre la cual existe una marcada presión de selección para aumentar su potencial de producción, esto ha conducido a desarrollar un animal altamente susceptible a las influencias ambientales, nutricionales, infecciosas, etc., que pueden alterar su actividad reproductiva (Gallego, 1998).

Uno de los principales factores que limitan la productividad del ganado en climas cálidos es la nutrición. La malnutrición aguda o crónica afecta primero al sistema reproductivo, de aquí que los

problemas de infertilidad y subfertilidad estén generalmente asociados a las carencias cualitativas o cuantitativas de los alimentos (Pedroso *et al.*, 2003).

1.3.1 Deficiencias de proteínas y energía.

El efecto de la alimentación proteica sobre la reproducción es amplio, complejo y muy cuestionado en los últimos años. La GnRH, FSH y LH son de origen proteico; de igual forma, los aminoácidos son esenciales para la supervivencia y transporte de los gametos, la nutrición del embrión y el desarrollo fetal (Cappa, 1993). Las vacas con deficiencia de aminoácidos pueden tener un retardo en la primera ovulación y la primera inseminación (Ferguson y Chalupa, 1989).

El efecto negativo de los niveles altos de proteína en la dieta sobre la reproducción ha sido explicado mediante su efecto tóxico y el efecto sobre el balance y la utilización de la energía. El efecto tóxico se manifiesta sobre la capacidad de fertilización de los gametos y la supervivencia del embrión. Los niveles elevados de proteína bruta en la dieta (>19%) aparentemente no tienen gran impacto sobre la actividad ovárica sin embargo, se ha comprobado que produce degeneración y pobre desarrollo del embrión y mortalidad embrionaria (Butler, 1998).

Como el metabolismo y utilización de la proteína de la dieta dependen de la disponibilidad de energía, los efectos de alimentar con dietas altas en proteína, que se sobreponen a los efectos del BEN, representan otra importante interacción de la nutrición con el comportamiento reproductivo de vacas lecheras (Butler, 2000b).

Los efectos sobre el balance y la eficiencia de utilización de la energía provocan los trastornos de las funciones del eje hipotálamo, hipófisis ovario, mediante su acción sobre la secreción y el efecto sobre la amplitud y frecuencia de los pulsos de la hormona LH, lo que puede causar alteraciones en el crecimiento, el desarrollo de los folículos ováricos y la disminución de la producción de progesterona por el cuerpo lúteo (Soderman *et al.*, 1987).

Los requerimientos nutricionales cambian abruptamente en el parto con el rápido aumento de la producción de leche y la entrada de las vacas en BEN. La severidad y duración del BEN está primariamente relacionada con el consumo de materia seca, el cual a su vez está asociado con la condición corporal en el momento del parto. El BEN durante las primeras 3-4 semanas posparto está altamente correlacionado con los días a la primera ovulación. Así, un pequeño retraso en la primera ovulación está positivamente asociado con un incremento del período de servicio. Es por esto que la duración del intervalo entre el parto y la primera ovulación representa una importante

interacción de la condición energética del animal con su comportamiento reproductivo (Butler, 2000b).

El primer efecto de las deficiencias y alteraciones del aporte de energía sobre el control endocrino de la reproducción es el decrecimiento de la liberación pulsátil de GnRH y de LH durante la fase folicular, la baja producción de progesterona por el cuerpo lúteo y el incremento de la sensibilidad de la hipófisis al efecto del feed back negativo de los estrógenos (Butler, 2000a).

Se ha observado también un decrecimiento en las concentraciones plasmáticas de la glucosa, la insulina, ciertos aminoácidos y la elevación de los AGL, durante el inicio de la actividad reproductiva después del parto, el incremento en la eliminación de progesterona, debido a un alto consumo de energía o proteína en la dieta, puede combinarse con los efectos secundarios del BEN, lo que conlleva menores concentraciones de progesterona en el plasma y una reducción de la fertilidad (Butler, 2000b).

Estos fenómenos fisiopatológicos pueden ser parte del mecanismo mediante el cual las deficiencias en el nivel de la energía en la dieta pueden ser causa de retrasos de la aparición de la pubertad, el anestro posparto, los trastornos de la ovulación y el desarrollo folicular, el síndrome de repeticiones del celo y a la disminución en la tasa de respuesta a los tratamientos de inducción y sincronización del celo (Pedroso, 2003).

1.3.2: Condición corporal

La condición corporal (CC) es un método adecuado para evaluar el estado de reservas energéticas corporales en los vacunos, existiendo correlación entre la misma y el comportamiento reproductivo; las vacas que no son capaces de mantener una condición corporal adecuada al parto, sufren un alargamiento significativo del período parto primer celo motivado por una disminución en la capacidad de liberar la LH por la hipófisis anterior (Pedroso y Roller, 2004). Esta metodología constituye una herramienta muy útil y práctica, y tiene un nivel de precisión que asegura la adopción, con cierto margen de seguridad, de medidas encaminadas a corregir las prácticas de manejo y alimentación del rebaño (Cuesta *et al.*, 2003).

Las vacas con CC al parto inferior a 2,5 presentan inhibición de los pulsos hipotalámicos de GnRH, lo que determina una disminución en la liberación de LH por la hipófisis y poseen ovarios con un peso menor y un cuerpo lúteo más pequeño (Pedroso, 2002).

1.3.4: Deficiencias de la nutrición mineral.

Las alteraciones del metabolismo mineral no presentan signos clínicos específicos por lo cual varios disturbios reproductivos pueden estar asociados a un mismo estado de deficiencia mineral (González *et al.*, 1988). Se ha observado en rebaños bovinos con deterioro manifiesto en su capacidad reproductiva con una dieta aparentemente adecuada, alteraciones del metabolismo mineral (García y Cuesta, 2004).

Los principales elementos minerales de importancia para el proceso reproductivo son: Ca, P, Mg, Cu, Zn, I, Mn y Se; en vacas lecheras en condiciones de pastoreo, donde la mayor parte de los pastos no son capaces de suplir los requerimientos minerales, existe una situación delicada en la nutrición mineral especialmente en los microelementos; fundamentalmente de Cu, segunda deficiencia a nivel mundial (McDowell, 2005).

1.4: Diagnóstico bioquímico de las enfermedades metabólicas y carenciales.

En varios países se ha extendido el uso de los perfiles metabólicos como método de diagnóstico de las enfermedades metabólicas y carenciales que afectan la reproducción (González, 2002; Fajardo *et al.*, 2000, 2004). Estos son métodos complementarios cuyo objetivo es renovar y reforzar la semiología clínica, permiten esclarecer la naturaleza de enfermedades específicas, la presencia de carencias nutricionales y los estados subclínicos de ciertas entidades nosológicas que afectan la reproducción y la producción del ganado bovino (Álvarez, 2007; Campos *et al.*, 2007).

La gran variabilidad de pruebas cualitativas y cuantitativas que se realizan son orientadas hacia el perfil mineral del suero sanguíneo y de las reservas en los tejidos; estado del balance ácido-básico; función del hígado; estado del metabolismo proteico y de la energía de la dieta (Bouda *et al.*, 2005).

Las principales fuentes de variación de los índices bioquímicos empleados en los perfiles metabólicos son la raza, la edad, el estado fisiológico, el nivel de producción, la estación y la base de la alimentación (Kaneko *et al.*, 2002; Schefer, 2003).

El diagnóstico de los desequilibrios en la alimentación mineral incluye los cambios patológicos, los análisis químicos de tejidos, los fluidos biológicos, la base de la alimentación y en muchos casos es necesario la evaluación del efecto de la suplementación mineral (Radostits *et al.*, 2000). En nuestras condiciones de producción es recomendable hacer un diagnóstico del estado mineral del

ganado porque los animales tienen como base de la alimentación el pasto y los forrajes (Pedroso, 2005).

1.5: Incidencia de la deficiencia de Cu en el mundo y en Cuba.

En varios países, diferentes investigaciones han demostrado la presentación de hipocupremia en rumiantes, considerándose la segunda carencia mineral más frecuente en bovinos en pastoreo en el mundo, después de la de fósforo (Underwood y Suttle, 2001; Picco *et al.*, 2004).

La hipocuprosis ha sido reportada en muchos de los principales países productores de ganado bovino en diferentes continentes, entre ellos: Gran Bretaña, Holanda, Escocia, Nueva Zelanda, Canadá, Australia y Estados Unidos (Grace *et al.*, 2001; McDowell, 2004).

En la República Checa está ampliamente distribuida en los rebaños bovinos lecheros (Pavlata *et al.*, 2005). Estos autores diagnosticaron la deficiencia de Cu en el 28% de las vacas lecheras examinadas, el 70% de terneros, el 65% de las novillas y el 70% de toros. Más recientemente en rebaños de carne de este país se han diagnosticado valores de cupremia indicativos de la deficiencia de Cu en altas proporciones de novillas y vacas (Slavik *et al.*, 2006)

Esta carencia mineral está ampliamente distribuida en América Latina, reportándose en Argentina (Titarelli *et al.*, 1997; Pico *et al.*, 2004); Uruguay (Ricciardino *et al.*, 1997); en varios estados de Brasil (Da Silva *et al.*, 1999) y en México (Avila *et al.*, 1997; Hernández, 2006).

La deficiencia de Cu en bovinos lecheros ha sido reportada en varias empresas de Cuba, asociada a trastornos reproductivos (González, 1982), más tarde en la región central de Cuba, se diagnosticó un elevado número de animales con bajos tenores de Cu en suero sanguíneo y tejido hepático; en especial en este último donde se reportaron como promedio 25 ppm; en dichos rebaños las manifestaciones carenciales más evidentes estaban relacionadas con el fallo reproductivo (González *et al.*, 1984).

En rebaños bovinos lecheros con una alta proporción de hembras vacías, anéstras, repetición de servicio y retenciones de placentas, el 30% de los animales investigados presentaban hipocupremia (Pedroso *et al.*, 1984), situación similar fue reportada más tarde en rebaños de carne de la raza Santa Gertrudis (Pedroso *et al.*, 1985).

En terneros de 25 a 30 días de edad, con alimentación a base de concentrados; yogur y heno se encontraron valores entre 15.07 y 16.95 $\mu\text{mol/L}$ (Mayarí y Colomé, 1986). Situación similar fue reportada en la zona occidental, donde se diagnosticaron valores normales de cupremia (Margolles *et al.*, 1987 a). En la zona oriental se reportaron valores medios de cupremia de 11,82

$\mu\text{mol/L}$ y una alta proporción de animales deficientes, con un pobre comportamiento reproductivo (Margolles *et al.*, 1988).

Posteriormente se reportó la deficiencia de Cu en las hembras bovinas ($11 \mu\text{mol/L}$), no encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre gestantes y vacías en la época de lluvia; en cambio en el periodo seco si hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) a favor de las vacías, $12.40 \mu\text{mol/L}$ contra $10.04 \mu\text{mol/L}$ en las gestantes (González *et al.*, 1987).

Se han reportado diferencias significativas ($p < 0.001$) en las concentraciones de Cu en los animales atendiendo a la época del año, en el periodo lluvioso los valores de la cupremia eran superiores ($16.48 \mu\text{mol/L}$) que en el periodo poco lluvioso ($11.93 \mu\text{mol/L}$); aunque el promedio animal fue de $13.34 \mu\text{mol/L}$ (Pedroso *et al.*, 1987).

Tarrero *et al.* (1988), reportaron la hipocuprosis en el 50% de los animales investigados en rebaños con pobre desempeño reproductivo. La suplementación mineral con sales enriquecidas con Cu aumentó las concentraciones séricas hasta $11.77 \mu\text{mol/L}$ (límite inferior) y demostraron la mayor biodisponibilidad del CuSO_4 con respecto al CuO ; de igual modo la suplementación aumentó las concentraciones de Cu hepático entre 350 – 370 ppm con el óxido y entre 370- 398 ppm con el sulfato, en ambos casos sin manifestaciones de toxicidad.

Más recientemente la deficiencia de Cu ha sido reportada en las provincias orientales (Fajardo *et al.*, 2004), y en la región central de Cuba donde se diagnosticaron el 90% de los animales con hipocupremia (García y Cuesta, 2004).

1.6: Relación de la hipocuprosis con los trastornos reproductivos.

Numerosas investigaciones desarrolladas en Cuba en los últimos años demuestran que rebaños bovinos con un deterioro manifiesto en su capacidad reproductiva presentan alteraciones del metabolismo mineral y en especial del Cu (Pedroso *et al.*, 1996; García y Cuesta, 2004; García *et al.*, 2005). Esta situación coincide con la reportada en diferentes regiones del mundo (Royal *et al.*, 2000; Kendall *et al.*, 2001).

Se ha sugerido que la hipocuprosis se encuentra estrechamente relacionada con trastornos funcionales reproductivos, retardo en la involución del útero, abortos, repetición del celo y retardo en la aparición de la pubertad, anestros y en casos extremos esterilidad (Pedroso y Roller, 1997; Pedroso, 2002).

Se han informado bajas proporciones de concepción, ciclos anaovulatorios y anéstrros con una amplitud mas baja, reducido pico de LH y una reducción ($P < 0.05$) en los números y la frecuencia

de pulsos de LH en ganado con deficiencia de Cu al compararlo con animales normocuprémicos (Phillippo *et al.* 1987; Xin *et al.*, 1993). Se sugiere que el Cu está relacionado con la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias, modulando la capacidad de liberación de la hormona luteinizante (LH), por lo cual se cree que la subfertilidad, infertilidad y esterilidad son debidas a bajos niveles o inhibición en la síntesis de hormonas gonadotróficas (Corbellini, 1998) y a la importancia de este elemento en la reducción del estrés oxidativo a nivel ovárico (Bach, 2002). Aunque no se han identificado con exactitud los mecanismos de acción por los que el estado de Cu en el organismo afecta la reproducción (Ahola *et al.*, 2005).

Ya desde muy temprano se demostró que la administración de Cu indujo la ovulación en los conejos (Suzuki y Bialy, 1964); mas recientemente, la administración de GnRH en ratas con tenores normales de Cu, aumentó la liberación de LH y FSH hipofisarias, en comparación con las hipocuprémicas (Kochman *et al.*, 1992); posteriormente se demostró, que en ratas deficientes en Cu se produjo una reducción en los picos de hormona folículo estimulante y la secreción de estrógenos (Igarza *et al.*, 1996); por lo que se piensa que posiblemente el Cu estimula los receptores de GnRH en la hipófisis facilitando su acción (Kochman *et al.*, 1997).

La adición de tiomolibdatos puede inhibir la secreción de estradiol ovárico, esto tiene un efecto directo en el desarrollo del folículo preovulatorio y juega un papel importante en el transporte del gameto controlando y preparando al útero para la implantación, de ahí que aun cuando la ovulación ocurra la tasa de fertilidad probablemente será dañada si la producción del estradiol preovulatorio no es optima (Hafez, 1996). En los rumiantes, el folículo dominante es la fuente de más de 96% de la secreción del estradiol del ovario y el pico de estradiol del folículo preovulatorio es el signo endocrino responsable para la inducción del estro (Du Plessis *et al.*, 1999 a y b). Por consiguiente, la interferencia en el desarrollo normal de este folículo podrían perturbar el estro y la ovulación en diferentes magnitudes (Slee *et al.*, 2001).

Se ha reportado la presentación de anéstrus en ovejas alimentadas con altas concentraciones de Mo y S (Du Plessis *et al.*, 1999a), en ésta situación los ovarios están reducidos de tamaño y tienen una respuesta disminuida a la superovulación (Du Plessis *et al.*, 1999b).

El problema de la subfertilidad asociada a la deficiencia de Cu inducida por Mo no se ha esclarecido aun, sin embargo se ha demostrado que los animales responden positivamente al tratamiento con Cu (Black y French, 2004).

Por su parte Mackenzie *et al.* (2001), demostraron que el tratamiento con Cu redujo las inseminaciones por concepción de 2.5 a 1.7 para el grupo control y el tratado respectivamente. Además la adición de un suplemento Cu en animales con subfertilidad y con perturbación del modelo normal de crecimiento de folículo preovulatorio tiene un efecto beneficioso ya que este es mediado por la actividad de la enzima Cu dependiente Lisil oxidasa (Kendall *et al.*, 2003).

Las vacas con hipocuprosis no mantienen una condición corporal adecuada y en el puerperio sufren un alargamiento significativo del período parto primer celo, además liberan menos LH posterior a la estimulación exógena con GnRH comparadas con aquellas vacas que son capaces de mantener su condición corporal (Pedroso, 2002).

Además el fallo reproductivo en esta deficiencia puede atribuirse a que provoca inmunosupresión en los animales y relacionadas con esta, retenciones placentarias, metritis y mastitis (Del Pino, 2000). Se ha demostrado el efecto negativo de estas patologías sobre el sistema reproductor manifestado por ausencia de estros y de la libido sexual, lo que conduce a un aumento en el número de días abiertos (Borsberry y Dobson, 1989), aumento de los días al primer servicio, y una reducción en por ciento de concepción al primer servicio (Fourichon *et al.*, 2000).

Por otro lado, Martínez y Sánchez (1999), plantearon que el Cu influye sobre la reproducción debido a que interviene en la conversión enzimática de los precursores a vitamina A y en la actividad de las enzimas antioxidantes. Se ha reportado una fuerte correlación entre las concentraciones de vitamina A y las concentraciones de Cu en el organismo (Sharma *et al.*, 2003)

La deficiencia de Cu además de tener efectos directos sobre la producción hormonal, integridad del tracto reproductor y función ovárica provoca muerte embrionaria con la consiguiente repetición de servicio (Howard *et al.*, 2001).

Los datos registrados en bovinos son inconsistentes, ya que experimentalmente no se ha demostrado el mecanismo exacto por el cual el Cu actúa sobre el comportamiento reproductivo; sin embargo la suplementación cúprica en áreas de producción afectadas por la carencia de este mineral contribuyó a mejorar la fertilidad y productividad de esta especie en nuestro país (Tarrero *et al.*, 1988; Pedroso *et al.*, 1991; Ruiz *et al.*, 1995).

1.7: Otras manifestaciones carenciales asociadas a la hipocuprosis.

Aunque se ha señalado a los problemas reproductivos como la principal manifestación de la hipocuprosis en animales adultos (Quiroz-Rocha y Bouda, 2000). En el bovino se han descrito gran

cantidad de manifestaciones clínicas asociadas a la deficiencia de Cu (Huang y Liu, 2001), por lo que afecta severamente los sistemas de producción y la salud animal (McDowell, 2003).

Los síntomas se presentan en animales desde los dos o tres meses hasta los tres años principalmente y cualquiera sea el grado de la lesión, se produce un grave deterioro económico por el atraso en la crianza, los descartes y muertes (McDowell, 2004).

La anemia se presenta en casi todas las especies con hipocuprosis severa, reportándose valores de hemoglobina entre 50 y 80g/L en los animales afectados, sin embargo es poco frecuente en bovinos (Radostits *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2001). La causa de la anemia se relaciona con la menor actividad ferroxidasa de la Cp, lo cual concuerda con un aumento en la concentración hepática de Fe (McKie *et al.*, 2001; Thomas y Oates, 2003). Otra causa puede ser la reducción de la vida media de los eritrocitos debido a la disminución en la actividad de la SOD eritrocitaria durante la hipocuprosis (West y Prohaska, 2004; Reeves *et al.*, 2005).

Si el nivel de Cu en la dieta es bajo, la transferrina no puede captar el Fe que se absorbe y el resultado puede ser una anemia microcítica hipocrómica, similar a la ferropénica, esto destaca la importancia del Cu en la absorción y transporte del Fe (Reeves y DeMars, 2005).

La deficiencia de Cu provoca lesiones esqueléticas; a veces acompañada de lisis en las epífisis, exostosis y cambios bioquímicos, observándose concentraciones mas bajas de lo normal en el fémur y fracturas de costillas con evidencias de osteoporosis, endurecimiento de articulaciones, disminución de la actividad osteoblástica, con actividad osteoclástica normal y a nivel epifisiario se observa osificación demorada del cartílago calcificado, adelgazamiento cortical, deficiencia del hueso trabecular y produce uñas blandas y alteradas (Majak *et al.*, 2004).

La lesión bioquímica primaria a nivel óseo es probablemente debido la menor actividad de la enzima lisil oxidasa, esta enzima es responsable de formar las cadenas polipeptídicas de colágeno, el cual es importante para una adecuada conformación del cartílago y del hueso (Kendall *et al.*, 2003).

El Cu es necesario en la síntesis de la tirosinasa, enzima utilizada en la transformación de la tirosina en melanina y dopamina, además esta enzima es necesaria para realizar la transformación de grupo sulfhidrilo a disulfuro que presenta la queratina (Ward *et al.*, 1996). Por lo que los animales con hipocuprosis manifiestan despigmentación del pelo, en forma característica alrededor del ojo (anteojeras), en un padecimiento conocido por acromotriquia y pelajes de color negro se tornan rojizos, mientras que pelajes rojos adquieren un aspecto amarillento (Tessman *et al.*, 2001).

En borregos recién nacidos de madres con hipocuprosis crónica se describe la ataxia enzootica, el mecanismo por el cual se produce la misma se explica porque al estar disminuida la actividad citocromo oxidasa, la síntesis de fosfolípidos es inadecuada y éstos son esenciales para la apropiada formación de mielina a nivel de sistema nervioso central (Wilson y Grace, 2002).

En corderos de razas y líneas genéticas más sensibles, la hipocuprosis aumentó el número de muertes por infecciones (Jones y Suttle, 1981). En animales experimentales cuprodeficientes se ha comprobado que la carencia tiene un profundo efecto sobre la morfología del timo y el bazo; con disminución en la actividad del sistema retículo-endotelial, lo que sugiere que la lesión bioquímica responsable de este efecto sería la disminución de la SOD, la cual produce incremento de la peroxidación lipídica celular (Gersliwin *et al.*, 1988). Posteriormente, trabajos experimentales en bovinos con hipocuprosis inducida demostraron que ésta se asocia con linfopenia, especialmente del grupo B, monocitosis y disminución de la capacidad fagocítica y lítica de los neutrófilos (Cerone *et al.*, 2000 b).

La deficiencia de Cu afecta a las células T y B, los neutrófilos y los macrófagos y por lo tanto la producción de anticuerpos (NRC, 2001). Durante la misma disminuye la actividad de enzimas Cu dependientes como la citocromo oxidasa, que es necesaria para la actividad fagocítica y de la SOD, lo que reduce la vida media de los leucocitos al ser estas células dependientes de esta enzima y todo ello causa predisposición a enfermedades infecciosas y virales (Wright *et al.*, 2000; Carrera *et al.*, 2000); afectando negativamente al sistema inmunológico del animal y con ello la capacidad de respuesta a la infección (Spears, 2003; Scaletti *et al.*, 2003).

La hipocuprosis se manifiesta también por mala cicatrización de las heridas, fibrosis miocárdica, cirrosis del hígado y predisposición en los animales la aparición de paratuberculosis (Perea *et al.*, 2002)

La diarrea es frecuentemente observada en hipocuprosis, principalmente en la deficiencia secundaria por exceso de Mo, señalándose dos mecanismos generales de esta alteración; el primero constituye una atrofia acinar pancreática debida a la excesiva peroxidación de los lípidos de membrana y la infiltración de proteasas séricas y el segundo representa una alteración en la conformación de la mucosa intestinal (Suttle, 2002).

La lisil oxidasa participa en la conformación de colágeno y elastasa, su deficiencia causa una mala conformación del tejido; además la disminución de citocromo oxidasa promueve la atrofia de vellosidades (Gay *et al.*, 1988).

Tessman *et al.* (2001), han señalado entre los síntomas clínicos de la carencia a las afecciones cardiovasculares y las crisis hemolíticas. Las primeras porque al disminuir las concentraciones de dopamina y particularmente de noradrenalina, el endotelio vascular y cardíaco se afectan; además, la disminución de colágeno dificulta el buen funcionamiento de los vasos sanguíneos con las consiguientes alteraciones cardiovasculares (Smith, 2003) y las segundas, caracterizadas por un cuadro semejante a la hemoglobinuria posparto, motivada por la deficiencia de SOD, necesaria para la maduración del eritrocito y su consecuente destrucción prematura y a la afectación de la membrana eritrocítica que provoca lisis por activación esplénica (Gooneratne *et al.*, 1989). En estas alteraciones también juega un papel preponderante el colesterol sérico, que aumenta en relación con un déficit de Cu (Engle *et al.*, 2001; Loste *et al.*, 2001).

Se ha encontrado una relación estrecha entre la hipocuremia y la incidencia de úlcera abomasal en terneros; aún no se conoce con precisión la patogenia, se ha sugerido que al disminuir la inmunidad, existe proliferación de microflora oportunista, incluido el *Clostridium perfringens*, unido a un éxtasis ruminal e intestinal generado por los defectos en la producción de elastina y colágeno (Gooneratne *et al.*, 1989).

Swenson y Reece (1993), han descrito la Polioencefalomalacia y plantean que esta se produce debido a que las bajas concentraciones de Cu afectan el metabolismo normal de la tiamina, porque se producen análogos de la tiaminasa, los cuales bloquean la oxidación del piruvato.

Por su parte Suttle (1986) y García y Cuesta (2004), han diagnosticado la hipocuprosis correlacionada con el bajo índice de condición corporal y fallas en el crecimiento, consecuentes a las diferentes alteraciones antes descritas.

La muerte súbita es otra manifestación de esta carencia mineral y se piensa que es la suma de los factores anteriores, pero en forma particular se atribuye una falla cardíaca como la causa más importante (Mertz y Davis, 1987).

1.8: Importancia del Cu para el organismo.

El Cu forma parte integral del sistema citocromo, es parte estructural de las enzimas Cu-superóxido dismutasa (CuSOD), CuZn-superóxido dismutasa (CuZnSOD), ceruloplasmina (Cp), citocromo oxidasa, tirosinasa (polifelin oxidasa), ácido ascórbico oxidasa, monoamina oxidasa plasmática, lisil oxidasa y uricasa dependiente de Cu; por lo que cumple funciones esenciales en la respiración celular, protección contra el radical superóxido, metabolismo de aminoácidos, formación de

melanina, síntesis de colágeno, elastina, síntesis neurohumoral y tejido adiposo (Cerone *et al.*, 2000 a; Kehoe *et al.*, 2000). En los rumiantes, en particular en bovinos, se ha descrito la presentación de efectos adversos por deficiencias de Cu, así como por intoxicación (Blakley *et al.*, 2000).

Además, el Cu, es indispensable para los procesos digestivos a nivel ruminal y las bacterias y protozoos presentes en el rumen para lograr un óptimo crecimiento y reproducción (Barboza y Blake, 2001); por lo que representa un mineral esencial para el organismo de los animales (Pandit y Bhave, 2002; Harris, 2003).

La lisil oxidasa es una enzima que es necesaria para la elaboración del colágeno, material fibroso de la pezuña y huesos; la misma se encarga de producir la desaminación oxidativa de residuos de lisina en las fibras de colágeno y elastina; lo que permite la formación de puentes cruzados en el colágeno y la elastina, que otorgan la resistencia mecánica y las características funcionales de estas fibras; de ahí que en la deficiencia cúprica se presenten las claudicaciones y la marcha dificultosa y lenta (Rucker *et al.*, 1998; Slee *et al.*, 2001).

La Cp es una globulina Cu dependiente sintetizada en el hígado, cuyas funciones principales son el transporte de Cu desde el hígado a los tejidos, acción antioxidante, modulación de la respuesta inflamatoria como proteína de fase aguda en infecciones o estrés, oxidación de aminas aromáticas, oxidación del Fe^{+2} para que éste pueda ser transportado hasta los tejidos hematopoyéticos por la transferrina, absorción de Fe en el intestino delgado y la síntesis de hemoglobina (Hellman y Gitlin, 2002).

La SOD es una metaloenzima ampliamente distribuida por el organismo, es importante como antioxidante plasmático, actuando además como principal antioxidante intracelular. Su función es inactivar los iones superóxidos con la producción de peróxido de hidrógeno y oxígeno, que luego es inactivado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (Culotta *et al.*, 1997).

La tirosinasa participa en la oxidación del aminoácido tirosina, paso metabólico involucrado en la formación de melanina. Por ello, la deficiencia de Cu provoca alteraciones del pelaje y la ausencia congénita de esta enzima causa albinismo (Blanco, 1989)

La citocromo-c-oxidasa posee dos átomos de Cu además de dos grupos hemo con sus respectivos átomos de Fe (Lippard, 1999), representa la enzima terminal de la cadena respiratoria y cataliza la transferencia de 4 electrones al O_2 para formar dos moléculas de agua y ATP (Rentzsch *et al.*, 1999); por su ubicuidad y función para la obtención de energía hacen que esta enzima sea vital para el organismo (Gebhard *et al.*, 2001; Heron *et al.*, 2001)

Las monoamino oxidasas, de las que se han identificado varios tipos en el organismo, están ubicadas en la membrana mitocondrial externa y se encargan de producir la desaminación oxidativa de diversas monoaminas como adrenalina, noradrenalina, tiramina, triptamina y serotonina (Dickinson *et al.*, 2000; Hiser *et al.*, 2000).

1.9: Metabolismo del Cu.

1.9.1: Absorción del Cu.

La absorción del Cu presenta diferencias entre las especies domésticas, existiendo variaciones dentro de la misma especie, debido entre otros factores a la disponibilidad de Cu, la edad, la raza, la forma química del mismo o variaciones individuales (Du *et al.*, 1996); estos autores plantean que los animales jóvenes tienen una capacidad de absorción mayor que los adultos y sus reservas son mayores. La absorción es generalmente superior para los compuestos orgánicos (Cao *et al.*, 2000; Pavlata *et al.*, 2001).

Dentro de los compuestos inorgánicos son más fácilmente absorbibles los hidróxidos, yoduros, glutamatos, citratos, sulfatos y pirofosfatos que los óxidos, el Cu metálico y los compuestos de Cu no hidrosolubles (Gooneratne *et al.*, 1989).

El ambiente reductor del rumen produce, por un lado, la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} , el cual es más difícil de absorber y por otro lado, la formación de sulfuros a partir de sulfatos, los que se combinan con Cu para formar CuS , compuesto altamente insoluble que no puede ser absorbido (Suttle, 2002); por lo que en los rumiantes el porcentaje de absorción es menor que en los monogástricos (Rosa y Mattioli, 2002). Según estos autores la absorción principal en los rumiantes es al nivel de duodeno y yeyuno, en menor proporción en íleon y es influida por el pH (relativamente ácido); principalmente mediante transporte activo, que es un mecanismo saturable y por difusión simple, este último, es un mecanismo insaturable (anexo 1).

La absorción se efectúa en forma de iones Cu^{+2} a través del ribete en cepillo del enterocito que lo deposita uniéndolo a metalotioneína (MT), una proteína con 25-30 % de cisteína en cuyos grupos sulfhidrilos ($-\text{SH}_2$) liga metales (Cu, Zn, Cd, Hg); si bien todos ellos estimulan la producción de este compuesto por el enterocito, la mayor estimulación la realiza el Zn, el cual es desplazado por el Cu que posee mayor afinidad por la enzima, quedando libre para estimular la síntesis de nueva MT y por tanto la cantidad de Cu que se absorbe depende de la cantidad de MT en las células de la mucosa (Barboza y Blake, 2001). En consecuencia en el duodeno de bovinos la MT tendría dos

funciones primordiales, la captación y almacenaje temporal del Cu hasta su absorción, y constituir un mecanismo defensivo evitando la captación de cantidades excesivas de Cu (Miles *et al.*, 2000). La capacidad máxima de absorción intestinal de aproximadamente 30% a 60%; sin embargo, gran cantidad del elemento se secreta nuevamente por las heces y la orina, siendo absorbido y retenido del 5 a 10 % del Cu ingerido (Gooneratne *et al.*, 1994; Arthington y Pate, 2002). Se han descrito variaciones en la capacidad de absorción de Cu en diferentes razas de bovinos (Suttle, 1986). Buckley (1991), estimó una absorción en vacas Holstein en lactación del $5,1 \pm 1,5\%$. Debido a esta tasa de absorción del Cu tan baja, las heces contienen grandes cantidades de este microelemento (Swenson y Reece, 1993). Se ha reportado una mayor absorción aparente del mismo en novillos Angus que en Simmenthal, la cual podría deberse a una mayor excreción biliar de Cu en los últimos (Gooneratne *et al.*, 1994).

1.9.2: Elementos antagonistas de la absorción del Cu.

El Cu es el microelemento que más antagonistas posee con respecto a la absorción; entre los más importantes se hayan las altas concentraciones de Mo, S, Fe, Ca, Cd, Zn, fitatos y ácido ascórbico (O'Connor *et al.*, 2001; Telfer *et al.*, 2004), aunque su principal antagonista es el Mo (McBride, 2005).

Cuando existen concentraciones elevadas de Mo, se presentan frecuentemente casos de hipocuprosis, (McBride y Cherney, 2004). Esta interferencia es a nivel ruminal, las bacterias presentes en la cámara fermentativa tienen la capacidad de sintetizar compuestos denominados tiomolibdatos a partir de Mo y S (Gooneratne *et al.*, 1989); las proporciones de los mismos varían entre monotiombdato (MoO_3S , TM_1), ditiombdato (MoO_2S_2 , TM_2), tritiombdato (MoOS_3 , TM_3) y tetra tiombdato (MoS_4 , TM_4) (Underwood y Suttle, 2001; Telfer *et al.*, 2005).

Estos tiombdatos (TM) forman complejos con los átomos de Cu libres sin utilidad metabólica y especialmente los TM_3 y TM_2 , pueden ser absorbidos a través de la mucosa ruminal y duodenal. Una vez en circulación se unen a la albúmina para ser transportados y en el torrente sanguíneo mantienen capacidad de enlace con el Cu, por lo que puede continuar su efecto de interferencia; además el exceso de estos compuestos causa redistribución del Cu dentro del hepatocito, favorece la acumulación de mismo en el riñón y promueve su eliminación en la orina (Grace y Wilson, 2002). La relación recomendada de Cu:Mo en la ración alimentaria se encuentra entre 3:1 y 6:1 (Telfer *et al.*, 2004).

El ácido ascórbico ejerce su acción sobre el Cu interactuando con la MT, inhibiendo la formación de mercáptidos e impidiendo la unión del Cu con la misma (Berger, 2000). El Zn causa interferencia con la absorción adecuada de Cu si se encuentran en grandes cantidades al interactuar con Cu, impidiendo su absorción intestinal (Grace y Wilson, 2002).

Smart *et al.* (1986), provocaron la deficiencia de Cu con una concentración de S en el agua de 500 mg/L, a pesar de que la dieta poseía cantidades adecuadas de Cu (10 ppm) y buena relación Cu:Mo (4:1); este elemento por si solo puede interferir con la absorción de Cu debido formación de CuS insolubles en el rumen y el abomaso, los cuales no pueden ser absorbidos, (Suttle, 1991). Otros autores también han reportado la hipocuprosis asociada a excesos de S en la dieta (Pechin *et al.*, 1995).

El S también es un componente importante para la formación de los TM, y es considerado como el segundo más importante antagonista del Cu, generalmente presente en la ración alimentaria en forma de sulfatos (SO₄) (Mcbride y Hale, 204).

El Fe es otro potente antagonista del Cu (Bremmer *et al.*, 1987), el efecto del Fe sobre la absorción del Cu no esta bien estudiado, se supone que se forma FeS en el rumen, que se disuelve en el abomaso formándose entonces CuS, que es insoluble (Gengelbach *et al.*, 1994). Varios trabajos han demostrado que altas concentraciones de Fe en la dieta reducen las concentraciones de Cu hepático y plasmático, reportándose la hipocuprosis (Perea *et al.*, 2002; Pico *et al.*, 2002).

Estudios desarrollados en España demostraron que las concentraciones elevadas de Cd y Pb en el suelo interfieren con el metabolismo de los microelementos, especialmente del Cu, Zn y Mn; particularmente, los niveles de Cu en estas condiciones eran bajos y casi la mitad de los animales mostraron deficiencias de Cu en tejido hepático (Miranda *et al.*, 2005).

1.9.3: Transporte y almacenamiento.

Una vez en la sangre (anexo 2), el Cu se adhiere en mayor cantidad a la albúmina y en menor proporción a aminoácidos, especialmente la histidina, pudiendo permanecer en el plasma o penetrar a los eritrocitos unido a los aminoácidos. Dentro de los eritrocitos, parte del Cu es contenido dentro de un compartimiento libremente dializable, designado "pool lábil", donde se sugiere que se haya complejoado con aminoácidos y en equilibrio con los complejos Cu-aminoácidos y Cu albúmina citados y el resto es asociado con la enzima Superóxido Dismutasa (SOD), antes conocida como eritrocupreína, que se halla en equilibrio con el pool lábil. La fracción dializable

probablemente es necesaria para asegurar una adecuada provisión de Cu para mantener la actividad de la SOD. En esta forma queda disponible para algunos tejidos, entre ellos el corazón, riñón bazo, encéfalo e hígado; sin embargo, la mayor parte de éste es asimilada por el tejido hepático (Gooneratne *et al.* 1989; Harris, 1991) (anexo 3).

Una vez incorporado al hepatocito, el Cu se deposita en el citosol, unido a las enzimas, principalmente la metalotioneína, proteína que es sintetizada en el mismo con funciones de depósito y de detoxificación cúprica del hígado; reteniendo al Cu en el hepatocito (Loeb y Quimby, 1999) (anexo 4). Está presente además en las mitocondrias para la formación de citocromo oxidasa y en los lisosomas, para ser utilizado en la síntesis de Cp, proteína responsable del transporte de Cu hacia los tejidos y órganos donde sea requerido, representando del 70 al 95 % del Cu sérico; o es excretado con la bilis; encontrándose además en menor grado distribuido todos los orgánulos (López-Alonso *et al.*, 2005).

Los rumiantes en su mayoría tienen una alta capacidad de almacenaje de Cu en el hígado, exceptuando los ovinos, que tienen una predisposición alta a sufrir intoxicación con Cu; esto es debido a su baja capacidad de síntesis de MT en hígado (Miranda *et al.*, 2000).

En el pelo se reportan como valores normales de Cu 6.6 – 10.4 ppm e indicativo de deficiencia cuando este se encuentra entre 1.8 – 3.4 ppm (Radostits *et al.*, 2000).

1.9.4: Excreción del Cu.

Se ha registrado una pérdida diaria de Cu por la bilis del 0,87% del Cu hepático en novillos Friesian (Charmley *et al.*, 1982), estos valores coinciden con los encontrados por Buckley (1991), en vacas Holstein en lactación. Por tal razón se considera que la excreción del Cu se realiza principalmente por vía biliar hacia la luz intestinal, eliminándose la mayor cantidad de Cu a través de las heces (Rosa y Mattioli, 2002). La excreción biliar de Cu se eleva al aumentar la concentración de Cu en la dieta y varía entre razas (Mullis *et al.*, 2003).

Buckley (1991), registró una pérdida de Cu por la orina de 0,24 mg por día en bovinos que absorben 11,8 mg de Cu y Ward *et al.* (1996), informaron que la pérdida de Cu por esta vía representa alrededor del 1 % de Cu ingerido. Estos niveles de excreción del Cu en la orina han sido confirmados posteriormente en otro estudio (Saari, 2002).

1.9.5: Transferencia del Cu al feto durante la gestación.

Los terneros normalmente nacen con concentraciones hepáticas de aproximadamente 400 ppm, comparado con las concentraciones de los bovinos adultos, de 200 ppm; e incluso hasta 300 ppm mayor a la de su madre (Enjalbert *et al.*, 2002). La concentración hepática de Cu en el feto depende del período de gestación, creciendo en forma exponencial, y de la concentración hepática de la madre, por lo que cuando ésta es inferior a 25 ppm el depósito hepático fetal se reduce significativamente (Rosa y Mattioli, 2002).

Durante la gestación, la madre, transfiere al hígado fetal una gran cantidad de Cu, este puede ser determinante para la supervivencia de rumiantes jóvenes de diferentes especies y podrían ser limitado por las concentraciones bajas de Cu en el hígado maternal, o en la dieta de la madre durante la gestación (Rombach *et al.*, 2003).

La transferencia masiva de Cu al feto es posiblemente una adaptación fisiológica para compensar la baja concentración de Cu en la leche, que oscila entre 2.8-3.2 $\mu\text{mol/L}$, pudiendo disminuir en los estados de deficiencia, siendo indicativo de la misma 0.17 – 0.34 $\mu\text{mol/L}$, pero no son influenciadas por el aporte de Cu en la dieta o el producto empleado (Grace y Wilson, 2002; Kráãmar *et al.*, 2003)

1.10: Etiología de la deficiencia de Cu.

De forma general Ward *et al.* (1996), clasificaron la etiología de la deficiencia de Cu en los rumiantes en cuatro situaciones; primero, muy bajas concentraciones de Cu en el alimento, menos de 5ppm; segundo, niveles altos molibdeno (más de 20 ppm); tercero, una relación Cu:Mo en la dieta de 2:1 o sea bajo Cu y significativos niveles de Mo y cuarto cuando existen tenores normales de Cu y bajos de Mo, pero con altas proporciones de proteínas solubles en la ración provenientes de pastos frescos; lo que incrementa la cantidad de sulfuros producidos en el rumen, y por tanto la formación de sulfuro de Cu que hace no biodisponible el oligoelemento.

Existen varios factores involucrados en la deficiencia de Cu en los rumiantes como son la deficiencia del mismo en el alimento y la pobre absorción causada por los antagonistas dietéticos, estos inducen la hipocuprosis formando complejos insolubles de Cu, sobre todo en el tracto digestivo; entre ellos, el Mo, S, Fe, Zn, y Ca que son antagonistas del Cu y constituyen la causa más común de deficiencias secundarias de Cu en los rumiantes en producción (Lugton, 2004).

La principal causa de la carencia de Cu en el trópico y específicamente en Cuba es el insuficiente aporte en la dieta. Los forrajes en las regiones tropicales presentan marcadas deficiencias de Cu, reportándose el 47% de los pastos deficientes en este mineral; sin embargo en varios países de esta región se han reportado mayores porcentajes de deficiencia de Cu en los pastos llegando incluso al 100% de las muestras (McDowell, 2005).

1.11: Requerimientos de Cu en la especie bovina.

Los requerimientos de Cu están afectados por la edad, la raza, la gestación y el estado reproductivo y productivo (Mullis *et al.*, 2003), e incluyen aquellos de mantenimiento, que sirven para compensar las pérdidas endógenas (McDowell, 2003).

En terneros se han estimado requerimientos de Cu que oscilan entre 6,2 y 7,5 ppm (MS), según la edad y el ritmo de crecimiento (Suttle, 1983), sin embargo, se debió elevar de 8 a 15 ppm (MS) la concentración de Cu en la dieta para evitar signos clínicos de hipocuprosis en animales en crecimiento (Mills, 1983).

En adultos, los requerimientos aumentan durante la gestación (Gooneratne *et al.*, 1989), por lo que la saturación de los niveles de este microelemento de los animales gestantes es muy importante con respecto a las necesidades del feto durante el desarrollo intrauterino y postnatal temprano (Hostetler *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los microelementos cruzan la placenta y la barrera mamaria, afectando la leche, la calidad del calostro y los indicadores de salud de glándula (Engle *et al.*, 2001; Gierus *et al.*, 2003).

La mayoría de las raciones para vacas lecheras requieren ser suplementadas con Cu, recomendándose una concentración de Cu en la dieta de 10 ppm (MS) para ganado vacuno lechero y de 4 a 10 para el de carne; estos requerimientos indican la cantidad de Cu que debe ser absorbido, por lo cual las mismas deben aportar una cantidad mayor, que se conoce como requerimiento bruto, siendo los niveles máximos tolerables en la dieta 100 ppm (MS) de Cu (NRC, 2001).

1.12: Diagnóstico y caracterización de la hipocuprosis.

El diagnóstico de la hipocuprosis es particularmente difícil, porque involucra muchos factores (anexo 5), incluyendo los antagonistas de este elemento y puede plantearse bajo dos aspectos diferentes: por un lado, cuando se busca identificar la deficiencia en los animales y por otro lado cuando se quieren conocer las causas que la provocan (Grace *et al.*, 2001).

Las pruebas de laboratorio que se emplean con mayor frecuencia para la determinación de la concentración de Cu en los animales son la determinación del mineral en plasma-suero y en tejido hepático (Laven y Livesey, 2006).

1.12.1: Concentraciones sanguíneas de Cu

A excepción de los casos en los que la enfermedad se manifiesta clínicamente, la cupremia como único método diagnóstico es poco confiable y dudoso, sobre todo en situaciones marginales, debido a que en muchas ocasiones animales con bajas reservas hepáticas de Cu pueden tener tenores séricos dentro de rango normal, ya que este órgano sigue enviando sus reservas a la circulación (Quiroz *et al.*, 2003).

Se han sugerido diferentes rangos de referencia para el Cu plasmático en bovinos; reportándose valores de 12.6 – 18.9 $\mu\text{mol/L}$ (Pavlata *et al.*, 2000) y de 11 a 19.8 $\mu\text{mol/L}$ (Radostits *et al.*, 2000). Estos últimos autores plantean que concentraciones de Cu en suero sanguíneo inferiores a 7.85 $\mu\text{mol/L}$ se corresponden con niveles bajos del mineral en tejido hepático, mientras que superiores a 14.2 $\mu\text{mol/L}$ se han correspondido con valores normales de Cu en hígado.

Para que los animales manifiesten buenos resultados productivos se han postulado diferentes niveles, 8.8 – 12 $\mu\text{mol/L}$ (Jiménez *et al.* 2002) y 10 – 22 $\mu\text{mol/L}$ (González, 2002), para el trópico los niveles de Cu normales son de 11.7 – 21.6 $\mu\text{mol/L}$ (Álvarez, 2001; McDowel, 2003),

Las concentraciones de Cu en sangre reflejan también el contenido de la dieta en Cu, estando influenciadas por la edad, la gestación y las enfermedades; durante la gestación aumenta la cupremia levemente hasta la mitad de la gestación, disminuyendo marcadamente a partir del séptimo mes de la misma (Aiello, 1998), existiendo reportes donde los niveles de Cu no varían durante la lactancia, (Ceballos *et al.*, 2002 y Hernández, 2006).

Las parasitosis de cuajar disminuyen la actividad de la Cp, por lo que los valores del Cu en suero sanguíneo se pueden mostrar disminuidos con niveles normales de Cu en el hígado (Corbellini y Carrillo, 1985).

Los niveles de cupremia a partir de los cuales se han observado síntomas clínicos son variables, en regiones templadas y cálidas se han reportado con tenores de Cu sérico inferiores a 7.85 $\mu\text{mol/L}$ (Bingley *et al.*, 1978; Gartner *et al.*, 1980), otros no han observado síntomas clínicos de deficiencia en ningún momento en animales con cupremias inferiores a este umbral (Rabotnikof *et al.*, 1983).

1.12.2: Concentraciones de Cu en tejido hepático

El hígado es el principal órgano de deposición y reserva de Cu en el organismo, las muestras para su análisis pueden obtenerse por medio de biopsia, necropsia o a nivel de matadero (Suttle, 2002); resultando inevitable la determinación de las concentraciones de Cu tejido hepático si se quiere conocer este valor con exactitud (Quiroz *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2006).

Esta técnica presenta complicaciones; la obtención de muestras por biopsia es un método invasivo y los propietarios son renuentes a permitir tomar muestras en animales vivos e igualmente es complicado acceder a los animales o a los productos en los mataderos (Minatel *et al.*, 1997); estos autores plantean como una técnica que posee un gran valor diagnóstico el análisis de las muestras de hígado de animales que han muerto en el campo. Además tomar cada muestra requiere alrededor de 30 minutos y de un operador muy bien entrenado (Gay *et al.*, 1988) y son pocos los laboratorios que pueden realizar estas determinaciones (Suttle, 2002).

Los parámetros de referencia para el Cu en el tejido hepático son de 100 – 400 ppm y guardan relación lineal con la absorción intestinal cuando la dieta cubre los requerimientos mínimos (Radostits *et al.*, 2000). En cambio Beck (1956), citado por Bavera (2000), señaló valores hepáticos de 200 a 400 ppm. Otros señalan como valores de referencia 100 a 200 ppm (Álvarez, 2001; McDowell, 2005).

Los valores del Cu indicativos de intoxicación crónica son de 600 ppm (Steffen 1997); mientras, los que indican deficiencia fluctúan entre 25 – 75 ppm, considerándose como límite inferior normal hasta 75 ppm y como valor crítico de las concentraciones de Cu en hígado 25 a 30 ppm (Álvarez, 2001; McDowell, 2005). Otros autores consideran que valores de Cu menores de 30 ppm son bajos, y los de 10-15 ppm son críticos (Carfagnini, 1998).

1.12.3: Determinación de sustancias con Cu en su molécula

La menor actividad de las enzimas Cu dependientes es un indicador directo de la etapa de disfunción que llevarán a las manifestaciones de la hipocuprosis; entre ellas se encuentran la Cp, la citocromo-oxidasa y la SOD de los eritrocitos (Bertinato *et al.*, 2003, Laven y Livesey, 2006).

Aproximadamente del 80% al 95% del Cu circulante se encuentra unido a la Cp (Laven y Livesey, 2005). Sus valores de referencia en bovinos son de 200 a 400 $\mu\text{mol/L}$, reportándose una correlación positiva ($r= 0.97$) entre los niveles de esta y el Cu en suero sanguíneo, lo que ha motivado la determinación de los niveles plasmáticos de la Cp (Laven *et al.*, 2006).

Cuando se presenta una disminución en el estado de Cu en los animales, se ha identificado una disminución en la actividad de la SOD, aunque su utilización en el diagnóstico de la hipocuprosis es menos frecuente que la Cp (Picoo *et al.*, 2004).

1.13: Niveles e interrelaciones de dicho elemento en el suelo y el pasto.

1.13.1: Suelo.

La caracterización de la hipocuprosis en una zona permite definir el desbalance mineral en términos reales, ajustar las medidas de control recomendables y alertar sobre la posible ocurrencia de pérdidas subclínicas, empleándose en la caracterización de la enfermedad estudios de suelo y de sedimentos de drenaje, revelamientos de forrajes y estudios poblacionales (Wilson y Grace, 2002).

La capacidad del suelo para suministrar el Cu a las plantas está determinada entre otros factores por: la cantidad del mineral en el suelo, la roca madre, el pH, la textura, materiales de deshecho, humedad y condiciones de drenaje (Gaskin *et al.*, 2003).

Se han señalados dos niveles de Cu en el suelo que son sugestivos de deficiencias, primero Rhue y Kidder (1983), postularon como limite crítico de dicho mineral en el suelo 0.3 ppm y mas tarde se establecieron como tal 0.6 ppm (McDowell *et al.*, 2005). Existe una estrecha relación, entre la concentración de oligoelementos en el suelo, en el agua y en el forraje (Arthington *et al.*, 2003); las interacciones más importante del Cu en el suelo, que reducen su disponibilidad son con el Mo, S y el Fe (Kalmbacher *et al.*, 2005).

El Fe es el segundo en mayores proporciones en la tierra y se encuentra en casi todas las fuentes de alimento ganadero y el agua; por lo que una cantidad considerable de Fe puede también ser digerida a través de la ingestión de tierra durante el pastoreo, así como la contaminación con tierra de los forrajes cortados, lo que podría ser un factor condicionante de la deficiencia cúprica (Holmes, 2005; Mcleod, 2005)

El pH del suelo tiene un gran impacto sobre la concentración de ciertos minerales trazas en los forrajes y está influenciado por tipo de suelo, con pH alto en los mismos (mayor a 6,7) la captación de Mo y de Se por parte de la planta, aumenta en forma marcada; en cambio, el contenido de Cu y Zn solo disminuye levemente. A pH bajos el Mo es adsorbido por minerales con carga positiva, entre ellos el Cu, esto se produce al haber un aumento de radicales H⁺ (López-Alonso *et al.*, 2002). Los pastos que crecen sobre terrenos fuertemente ácidos y ricos en Mo se caracterizan por tener

valores bajos de Cu (menos de 3 ppm), mientras que los que se desarrollan en suelos alcalinos pobres en Mo pueden contener hasta 17 ppm (Picco *et al.*, 2002; Telfer *et al.*, 2005).

La deficiencia de Cu es frecuente en suelos ácidos, y en suelos con elevada materia orgánica, debido a que en estas condiciones el Cu se une a la materia orgánica, formando compuestos insolubles (Arthington, 2003).

1.13.2: Forrajes.

Los pastos de gramíneas presentan grandes variaciones en su contenido de Cu y se ha planteado que estos contienen por término medio en las regiones tropicales de 5 - 8 ppm de Cu; en cambio las leguminosas, en las mismas condiciones muestran valores de promedio de 8 -10 ppm (McDowel, 2004).

La composición mineral del pasto depende también del estado vegetativo de la planta (Badiie, 1998 y Spears, 2003), considerándose que aquellos pastos cuyo contenido es menor de 3 ppm de Cu producirán manifestaciones de deficiencia en los rumiantes en pastoreo; cuando el contenido de Cu fluctúa entre 3 a 5 ppm pueden considerarse responsables de la hipocuprosis, en cambio niveles entre 7 y 12 ppm se consideran exentos de riesgos, a menos que actúen factores que causen deficiencia secundaria de Cu (Bavera, 2000).

Tasas de 5 ppm de Cu y de 1-2 ppm de Mo en MS de pasturas no producen problemas, pero si el Mo aumenta a más de 2 ppm de MS aparecen trastornos que se ponen en evidencia por una disfunción del rumen, con disminución de la digestión de celulosa. Cuando la relación Cu: Mo en los pastos es menor a 2:1, se presentan signos de deficiencia (Suttle, 2002).

Se han reportado concentraciones de Cu en las gramíneas entre 3.5 y 6.2 ppm, siendo este el micromineral más deficiente en el pasto (Mufarrege *et al.*, 1985; Haro, 1986). En Cuba, en la provincia de Camagüey, el 100% de las muestras de pastos investigadas presentaban deficiencias de Cu, al parecer condicionada por exceso de Mo en el suelo (Vázquez, 1992). En las regiones tropicales se han reportado marcadas deficiencias de Cu, reportándose el 47% de los pastos deficientes en este mineral (McDowell, 2005).

1.14: Suplementación del Cu por vía oral y su repercusión sobre aspectos bioproductivos.

En los sistemas de producción de leche la nutrición mineral y en especial la del Cu, juega un papel preponderante para maximizar el comportamiento reproductivo, esta puede efectuarse

proporcionando a los animales sales que contengan Cu o suministrándoles a intervalos regulares por vía oral píldoras o mezclas minerales enriquecidas con este elemento, utilizando compuestos inorgánicos (Attaelmannan y Reid, 1996; Stanton *et al.*, 2000; Ahola *et al.*, 2003; Bolasell, 2006)

La adición de un suplemento de 300 a 400 mg de Cu/día, en forma de compuestos inorgánicos al ganado Cu-deficiente aumentó rápidamente las concentraciones de Cu en sangre hasta los valores normales (Stoszek *et al.* 1986) y las reservas hepáticas (Arthington *et al.*, 1995a).

La administración de un bolo intraruminal (BIRF) conteniendo agujas de CuO proporcionó a largo plazo a través de la liberación sostenida de Cu aumentos significativos en la concentración de Cu en el ganado que consumía altos niveles de Mo en el forraje y SO₄ en el agua (Cameron *et al.*, 1989 y Arthington *et al.*, 1995 b). En rumiantes hipocuprémicos, un solo bolo intraruminal de CuO a los 60 días de edad ha provocado un aumento de la actividad de la Cp después de 21 días de suplementados los animales (65 UI vs. 48 UI), disminución la frecuencia de diarrea y de las infecciones intestinales (Blakley *et al.*, 2000).

No se han reportado diferencias en ganancia de peso, la concentración y actividad de la Cp y las concentraciones hepáticas de Cu en novillas deficientes en Cu alimentadas con fuentes inorgánicas del mineral (8 o 16 mg/kg de Cu de CuSO₄) u orgánicas (lisina de Cu) (Rabiansky *et al.*, 1999). Eckert *et al.* (1999) informaron que la concentración de Cu en hígado en ovejas fue superior utilizando CuSO₄ en comparación con el proteinato de Cu.

En vacas con hipocuprosis, la suplementación con Cu orgánico (100 mg y 200 mg de Cu de Availa Cu) e inorgánico (200 mg CuSO₄) aumentó (P <0.05) la concentración hepática del mismo y los porcentajes de gestaciones en los grupos tratados con respecto a los controles. No se encontró diferencia (P > 0.10) entre los grupos estudiados en el contenido de Cu en el calostro, el peso corporal de las vacas, las concentraciones de Cu en el suero sanguíneo de los terneros y los pesos al destete de los mismos (Muehlenbein *et al.*, 2001).

En novillas Holstein con deficiencia condicionada por S y Mo, suplementadas con dos niveles, 15 y 30 mg/kg de Cu orgánico (Availa-Cu) e inorgánico (CuSO₄), más un tratamiento adicional con un bolo de óxido de Cu (25 mg), se comprobó que los tratamientos resultaron ser igualmente efectivos ya que en todas las novillas aumentaron las concentraciones de Cu en sangre y el peso promedio, sin diferencias significativas entre ellos; la SOD del eritrocito aumentó con el tiempo (P <0.01) y fue superior (P <0.001) en la novillas alimentadas con CuSO₄ (Yost *et al.*, 2002).

Con suplementos cúpricos como el CuSO_4 , citrato de Cu, proteinato de Cu, o cloruro de Cu en dosis de 20 o 40 mg/kg se han obtenido efectos beneficiosos sobre el aumento de peso en novillos castrados en desarrollo, aunque no reportan diferencias entre las diferentes fuentes de Cu empleadas (Engle y Spears, 2000; Creech *et al.*, 2004).

La administración de complejos inorgánicos, fundamentalmente el CuSO_4 han incrementado significativamente las concentraciones hepáticas de este mineral de los animales suplementados en comparación con los controles (Sharma *et al.*, 2005; Sprinkle *et al.*, 2006).

La disponibilidad de Cu de la lisina de Cu y CuSO_4 son semejantes en el ganado, aunque este último ha sido utilizado tradicionalmente en la suplementación cúprica (Odle, 2000; Arthington *et al.*, 2003).

Las fuentes de Cu orgánicas tienen una biodisponibilidad superior, con mayor absorción y retención de Cu comparadas con el CuSO_4 (Nockels *et al.*, 1993); en ratas alimentadas con proteinato de Cu, se verificó una concentración superior de Cu en comparación con las alimentadas con CuSO_4 (Du *et al.*, 1996) y en novillos castrados con deficiencia condicionada por Mo, los animales alimentados con proteinato de Cu tenían mayores concentraciones de Cu hepáticas en comparación con los novillos alimentados con CuSO_4 (Wittenberg *et al.*, 1990). También la lisina de Cu puede ser más beneficiosa que el CuSO_4 para corregir la deficiencia de este mineral en el ganado (Davis *et al.*, 2003).

Las moléculas orgánicas al ser más biodisponibles que los minerales inorgánicos, pueden formar productos muy solubles, químicamente estables que resisten la digestión e interacción con antagonistas en el intestino (Yost *et al.*, 2002; Arthington y Swenson, 2004), aunque la principal limitación de estos compuestos de Cu orgánicos es que poseen un costo superior (Arthington y Brown, 2001; Arthington, 2005). Sin embargo los resultados obtenidos hasta el presente son inconsistentes para decidir cual forma de suplemento resulta más eficaz (Gutiérrez, 2007).

La suplementación del Cu por vía oral tiene varios inconvenientes entre los que caben mencionar, en primer lugar la gran cantidad de antagonistas que interfieren su absorción y metabolismo, además por vía oral no se controla el consumo del mineral por los animales y como consecuencia de estos dos factores puede presentarse la carencia en los mismos aun cuando le ofertemos sales minerales enriquecidas con Cu; por lo que ha resultado menos efectiva que la suplementación parenteral (Pechin *et al.*, 1998).

1.15: Ventajas de la suplementación con sales inyectables de Cu.

Los medicamentos aplicados parenteralmente suelen ser de elección porque permiten realizar una reserva de Cu en el hígado del animal, no son costosas y al compararlas con la suplementación oral poseen practicidad de manejo y evitan las interferencias a nivel digestivo (Grace y Wilson, 2002; Romero, 2003); pueden ser administrados en el momento preciso o de mayores demandas de los animales como por ejemplo durante el último tercio de la gestación, en épocas de sequías y se le garantiza a cada animal una dosis apropiada del microelemento; no producen daño en el lugar de aplicación, tienen un satisfactorio almacenamiento hepático (90 – 100 %) de la dosis administrada y un margen de seguridad aceptable entre la dosis terapéutica y la tóxica (Bohman *et al.*, 1987; Wilson y Grace, 2002).

El tratamiento de la deficiencia de Cu en bovinos utilizando compuestos de Cu de liberación lenta por vía parenteral; especialmente en animales con hipocuprosis ha demostrado que la respuesta al mismo suele ser rápida y produce un aumento de la cupremia y una notable mejoría del estado general (Ferrer *et al.* 1989; Viejo y Casaro, 1993).

El tratamiento de la hipocuprosis en terneros con Cu parenteral, ha aumentado la cupremia, las ganancias de peso diarias y los pesos al destete (Buffarini *et al.* 1997; Pechin *et al.*, 1999), encontrándose respuestas al tratamiento con Cu inyectable en todos los rangos de deficiencia; también, se ha comprobado bajo condiciones experimentales, que esta terapéutica logra mantener una reserva hepática de Cu elevada durante un período prolongado, 90 días en animales de menos de 150 kg y más de 180 días en bovinos de más de 150 kg, lo que se reflejó en un aumento de la actividad sérica de la Cp (Baker *et al.*, 2003).

El efecto de la utilización de los inyectables de Cu sobre los niveles de este microelemento en tejido hepático quedó demostrado al aplicarse el Multimin®; compuesto de Cu -EDTA, que inyectado en dosis de 0,2mg/kg en la oveja aumentó significativamente las concentraciones de Cu en el hígado a los tres meses posteriores a la inyección (Van Niekerk *et al.*, 1994; Carstens, 1999).

En el ganado bovino el edetato de Cu-Ca (Cu-EDTA) por vía parenteral en concentraciones de 150 mg en ganado Hereford, aumentó los niveles de Cu hepáticos a los 100 días de aplicada la suplementación (Langlands *et al.*, 1998). El empleo de Multimin® en ganado de carne en el último tercio de la gestación incrementó significativamente las concentraciones de Cu en el hígado durante 257 días y el comportamiento reproductivo post parto de los animales tratados (Daugherty *et al.*, 2002).

En ratones experimentales la administración de una inyección subcutánea de CuCl_2 (4 μg) durante 4 semanas incrementó la actividad de la citocromo oxidasa y las concentraciones de Cu en hígado y riñones en comparación con los animales utilizados como controles (Kodama *et al.*, 2006).

El tratamiento con Cu inyectable ha aumentado los porcentajes de gestaciones de las novillas con respecto a las que fueron suplementadas por vía oral (Correa Luna y Lagos, 1985); ésta terapéutica, en esta misma categoría, aumentó en un 20% las gestaciones con respecto a las testigos (Brem, *et al.*, 1995). Posteriormente en vacas suplementadas con Cu por vía parenteral se observaron mayores números de celos, mejores tasas de servicio por concepción y elevación en los porcentajes de preñez entre el 10 al 27% (Brem *et al.*, 2002). Por su parte Walter y Marro (2003), en el ganado bovino lechero la suplementación parenteral de Cu redujo los intervalos parto-primer servicios, parto- concepción e intervalo parto-parto.

Para prevenir y curar la hipocuprosis recientemente se han introducido en el Mercado diferentes fármacos inyectables de Cu en zonas afectadas; entre los que caben destacar el *Glypondin*, el *Vascunin*, *Cobrexilin 10*, *Cuper – Young*, *Cuprexan A.P.*, *Amantita*, *Tarsan L.A.*; todos con respuestas satisfactorias (Descalzo, 2003) y el *Multimin®* (Vanegas *et al.*, 2004).

1.16: Intoxicación con Cu en bovinos.

1.16.1: Intoxicación Aguda.

En el grado e intensidad de las lesiones hepáticas y la intoxicación juega un papel importante la fuente de Cu; el glicinato de Cu provocó severa inflamación y abscesos estériles en aproximadamente 25% a 50% de casos, durando éste efecto tres meses, mientras el edetato de Cu tuvo una proporción de la reacción local de aproximadamente 5% (Boila *et al.*, 1984).

Independientemente del principio activo de los fármacos inyectables, las concentraciones de Cu en plasma aumentan de 2 a 4 horas post inyección; esta es una consideración importante, ya que la hemólisis ocurre como consecuencia de un efecto directo de los iones de Cu libres en los eritrocitos (Parnell Laboratorios, 2001).

La intoxicación aguda es poco común y generalmente ocurre luego de la administración parenteral de Cu, o por la administración de bolos de Cu intrarruminales en terneros (Steffen, 1997). Esta ocurre cuando se sobrepasa la cantidad de Cu a suplementar, que está establecida en 0,5 mg/kg de peso vivo (Fazzio *et al.*, 2003) y es más frecuente en terneros donde la dosis terapéutica está cercana a la dosis tóxica de 1 a 2 mg/kg (Costa *et al.*, 2003). También pueden citarse

contaminación de plantas y agua potable con productos fungicidas ricos en este metal o en programas de erradicación de caracoles (Blood y Radostits, 1994).

Cuando un animal consume una dieta con excesiva concentración de Cu, este estimula la síntesis de MT y aumenta la reserva hepática del elemento; pero si la situación continúa ya no quedará espacio físico para más MT y el Cu comienza a quedar libre, dañando primero las membranas del hepatocito para salir luego a circulación donde afectará especialmente a los eritrocitos (Miranda *et al.*, 2000).

Cuando se emplea una dosis tóxica (1 a 2 mg/kg), la cantidad total de Cu inyectada no es elevada si se compara con la capacidad de reserva del hígado, la intoxicación se genera porque llega muy rápido al hígado y este no posee ni la suficiente cantidad de MT para neutralizarlo, ni el tiempo para estimular su síntesis (Gooneratne *et al.*, 1989).

Debido al curso hiperagudo de la intoxicación normalmente se produce el hallazgo de los animales muertos sin sintomatología previa. Existe la posibilidad de observar síntomas específicos como disnea, depresión, letárgica, dolor abdominal, gastroenteritis, inmovilidad, envaramiento para finalmente caer en decúbito lateral, pudiendo presentar también signos nerviosos y finalmente la muerte a las 12 a 48 horas de comenzados los síntomas; en los animales que sobreviven a la enfermedad durante tres días o más se observa ascitis, hidrotórax e hidropericardio y también puede observarse hemoglobinuria y hemorragias (Radostits *et al.*, 2000; Cuesta, 2003).

Las alteraciones a nivel hepático impiden que el amonio, un producto altamente tóxico del metabolismo nitrogenado, sea convertido en urea y así neutralizado; la consecuente acumulación de amonio a nivel del SNC y del líquido cerebroespinal sería responsable de la somnolencia, la inconsciencia, el andar tambaleante y las convulsiones nerviosas que acompañan a la intoxicación. Además del amonio, una gran variedad de aminos tóxicas que se absorben en intestino grueso y no pueden ser removidas por el hígado dañado, pueden alcanzar el cerebro donde actúan como falsos neurotransmisores (Jubb y Kennedy, 2007).

El diagnóstico se basa en datos anamnésticos, hallazgos de necropsia, lesiones histopatológicas, concentraciones de Cu en tejidos y tinciones especiales (Radostits, 1994); en el hígado puede observarse: hepatomegalia, necrosis centrolobulillar, bordes redondeados y color rojo oscuro, al microscopio óptico se corresponde con la pérdida de la estructura trabecular y la necrosis centro lobulillar (Jubb y Kennedy, 2007).

Los estudios complementarios que permiten ratificar el diagnóstico final incluyen la medición de enzimas hepáticas y en los casos fatales el estudio histopatológico del hígado (Shaw y Ihle, 1999; Méndez, 2001).

1.16.2: Intoxicación crónica.

La intoxicación crónica es más común y se produce por la ingesta durante largo período de tiempo de Cu en cantidades que exceden a los requerimientos nutricionales; presentando una fase prehemolítica durante la cual se acumula el Cu en hígado, con signos inespecíficos como depresión, anorexia, ictericia, atonía ruminal, cólico, fotosensibilización (Milne, 1997).

Cuando la capacidad del hígado para almacenar el Cu es excedida, se produce la necrosis de hepatocitos y el Cu es liberado en forma masiva a la circulación, desencadenando la fase hemolítica; en muchas ocasiones esta situación es influenciada por situaciones de estrés, como movimientos, cambios de dieta y la lactación (Bohman *et al.*, 1987). Estos autores plantean que los iones de Cu liberados en sangre producen hemólisis aguda; observándose líquido en cavidades, ictericia, hemoglobinuria, anemia, muerte aguda en 24 y 48 horas.

En la necropsia puede observarse además riñones reblandecidos de color oscuro a negro, orina rojo vinoso, hígado de coloración ocrea a pálido, aspecto de “nuez moscada”, vesícula biliar distendida, equimosis, petequias y hemorragias en varios órganos (Jubb y Kennedy, 2007).

La medición de Cu hepático es de utilidad en la intoxicación crónica, cuando se encuentran valores de más de 600 ppm sobre base seca (Galey *et al.*, 1991). En la intoxicación aguda este valor raramente se alcanza, por lo que resulta de mayor utilidad la medición de Cu en riñón, que posee valores normales de 12 a 19 ppm MS, y que en estas circunstancia superan los 23.5 ppm MS (Fazzio *et al.*, 2003).

En la fase prehemolítica de la intoxicación crónica, en los animales con signos clínicos, el diagnóstico puede complementarse con enzimología clínica, hay un aumento considerable en las concentraciones de bilirrubina, y enzimas hepáticas ALT, AST, GGT y GLDH, incrementándose notablemente 8 semanas antes de la crisis hemolítica (Méndez y Riet-Correa, 2001).

Una acumulación de Cu excesiva en el hígado es citotóxica y se acompaña de alteraciones en el funcionamiento del órgano, caracterizado por un aumento de la bilirrubina (Hatano *et al.*, 2000) y la actividad de las enzimas ALAT y ALP (Webb *et al.*, 2002; Malhi *et al.*, 2002).

Capítulo 2: Parte experimental.

2.1: Materiales y métodos generales.

2.1.1: Unidades donde se desarrolló la investigación.

La investigación se desarrolló en 10 unidades de producción (4 centros de novillas y 6 vaquerías) de la empresa pecuaria "La Vitrina", ubicada en la zona centro sur de la provincia de Villa Clara (anexo 6), entre los 22° 53 LN y los 82° 02 LW y a una altura de 90 a 100 msnm.

2.1.2: Clima del área experimental.

La temperatura promedio anual de la zona es de 24.32°C, siendo el mes más caliente Junio, con 25.9°C y los meses más fríos Diciembre y Enero, con 20.9°C y 20.2°C, respectivamente. Las temperaturas máximas alcanzan 33.6°C en Agosto y las mínimas bajan hasta 11.9 °C en Enero; según datos del Centro Meteorológico Provincial.

La suma promedio de precipitación anuales es de 1530 mm, con un promedio mensual de 127.5 mm; los mayores valores se encuentran en Octubre y Junio con 292.4mm y 267.4 mm respectivamente y los menores en Enero, con solo 25.4 mm. La lluvia caída durante la estación lluviosa (mayo – octubre) representa como promedio el 73.3 % del volumen total anual.

La insolación promedio anual es de 7.02 horas, con mayor valor en Abril (7.53 horas). Junio presenta el menor valor de este indicador con 6.23 horas. Los días más largos ocurren entre Mayo y Julio y los más cortos entre noviembre y enero.

La evaporación en la zona aumenta a partir de Enero, con valores máximos en Abril (101 mm) y Noviembre (94 mm). Por su parte, la humedad relativa promedio anual es de 82.7%, con mayor valor en Mayo (87.5%) y menor valor en Abril (76.0%).

2.1.3: Animales utilizados.

Para los estudios se utilizaron vacas entre 6 y 8 años de edad y entre segunda y tercera lactancia y novillas incorporadas a la reproducción, todas del genotipo racial Siboney de Cuba, libres de Brucelosis, tuberculosis y clínicamente sanas.

2.1.4: Sacrificio de los animales.

Las muestras de hígado se obtuvieron de animales desechados por baja producción, sacrificados en un matadero bovino de la provincia de Villa Clara mediante insensibilización eléctrica y posterior desangrado por sección de la vena yugular.

2.1.5: Sistema de pastoreo y de ordeño.

Las unidades involucradas en el estudio utilizaban un sistema de pastoreo rotacional restringido en el tiempo; en el caso de las vacas, con una intensidad de 244,8 UGM há⁻¹ día⁻¹, una carga global de 1.5 animales ha⁻¹, pastoreando 16 h diarias. Las novillas eran manejadas con intensidades de pastoreo de 180 UGM há⁻¹ día⁻¹ y una carga global de 1.5 animales ha⁻¹. La carga de animales/ha se determinó según lo establecido por Hernández *et al.* (1997). Las vacas se ordeñaban de forma manual una vez al día, entre las 2 a.m. y las 5 a.m.; empleándose el sistema de amamantamiento restringido.

2.1.6: Alimentación.

En el periodo lluvioso el alimento fundamental fue el pasto, con suplementación mineral a base de fosfato dicálcico y mieles, según las disponibilidades de las unidades, en el periodo poco lluvioso además se le suplementó con caña de azúcar.

2.1.7: Producto empleado y forma de administración.

En la terapéutica de la hipocuprosis empleamos una formulación de CuSO₄ (2.5%); pre establecida y utilizada por los laboratorios Pharmavet y König, que fue reformulada y producida en la planta del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Central de las Villas. La misma contiene Cu como etilenedinitrilotetraacetato de Cu (C₁₀H₁₂Cu₄N₂O₈), 25 mg/mL; con un peso molecular de 351.80 g/mol, una pureza entre 98,5 % y 102 % calculado en base anhidra, punto de fusión 173°C - 179°C, contenido de humedad inferior al 3,5%.

El producto fue administrado en volumen, dosis y frecuencia variable en dependencia del ensayo realizado y siempre por vía subcutánea, alejado del sitio de inyección en la región lateral posterior del cuello.

2.1.8: Toma de muestras.

2.1.8.1: Cálculo de la población a estudiar.

El tamaño de la muestra se calculó de acuerdo a lo recomendado por OPS (1991), para estudios de dos proporciones teniendo en cuenta la diferencia entre grupos obtenida por observación previa del investigador.

2.1.8.2: Sangre.

Las muestras de sangre para los análisis hematológicos se tomaron por venopuntura de la yugular, se utilizaron tubos de ensayo con anticoagulantes EDTA a una concentración de 1 mg/mL de sangre, previamente tapados y esterilizados; extrayéndose una cantidad de 5 mL de sangre. Las muestras para los análisis bioquímicos y determinaciones enzimáticas se tomaron por el mismo método en tubos de ensayos sin anticoagulante, esterilizados y desmineralizados; depositándose en ellos una cantidad de 10 mL de sangre; las mismas se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, obteniéndose el suero sanguíneo, el que se almacenó a -10 °C hasta su análisis.

2.1.8.3: Hígado.

Dentro de los 15 minutos posteriores al sacrificio de los animales se obtuvieron muestras del borde ventral del lóbulo derecho (15cm³), previa inspección general de la víscera para descartar alguna alteración. Las muestras se conservaron a -10°C hasta el análisis.

2.1.9: Técnicas y procedimientos utilizados.

2.1.9.1: Sangre.

La hemoglobina se determinó por el método de cianometahemoglobina (Drabkin, 1970), dosificada fotocolorimétricamente con un Spekol-11 de fabricación Alemana y el hematocrito, por microhematocrito con tubo capilar.

Las determinaciones de minerales en suero sanguíneo (Ca, P, Mg, Na, K, Zn, Fe y Cu) se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (Miles *et al.*, 2001), en un equipo SP-9 de la firma PYE UNICAM según los procedimientos del fabricante. El P se determinó por el método colorimétrico descrito por los autores citados anteriormente.

2.1.9.2: Hígado.

Las determinaciones de Cu en tejido hepático se realizaron por espectrofotometría de absorción

atómica (Miles *et al.*, 2001) en un equipo SP-9 de la firma PYE UNICAM, según los procedimientos del fabricante.

2.1.9.3: Condición Corporal.

La condición corporal (C.C) se diagnosticó por inspección clínica y clasificándola en la escala de 5 puntos (Parker, 1989). (anexos 7, 8 y 9).

2.1.9.4: Análisis de los indicadores reproductivos.

Se analizó la situación reproductiva por los procedimientos recomendados por Brito (2001), evaluándose en las novillas la Edad a la incorporación (EI), Edad a la gestación (EG), Intervalo incorporación-gestación (IIG), Edad al Parto (EP) e Intervalo incorporación-Parto (IIP). En las vacas se estudiaron el Intervalo Parto-Primera inseminación (IPPI), Periodo de Servicio (PS), Intervalo Parto-Parto (IPP) y el índice de Inseminación (II); además en ambas categorías se evaluaron los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones.

2.1.9.5: Exámenes ginecológicos.

A todos los animales se les realizó el examen ginecológico para determinar posibles patologías del aparato reproductor y confirmar las gestaciones según la metodología descrita por Holy, (1987), por palpación rectal; la exploración vaginal se realizó con espéculo. El diagnóstico se efectuó al inicio del tratamiento, coincidiendo con la primera aplicación del CuSO_4 , a los 60 días coincidiendo con la segunda aplicación, a los 120 coincidiendo con la tercera aplicación y la última exploración ginecológica se efectuó 30 días después de la última aplicación.

2.1.9.6: Consideraciones sobre hembras cíclicas, anéstricas y repetidoras de servicio.

Se consideraron como cíclicas, aquellas hembras que a la palpación rectal presentaban cuerpos lúteos o evidencias de folículos en desarrollo y anéstricas las que no lo presentaban (ovarios lisos), después de dos exploraciones sucesivas a intervalo de 14 días (Holy, 1987). En el presente trabajo se consideraron repetidoras del servicio las que necesitaron más de una inseminación artificial para lograr la gestación.

2.1.9.7: Metodología para la detección del celo e inseminación artificial.

Durante todo el periodo de observación, en los experimentos que fue necesario, la detección del celo se realizó de 6-10 am. y de 2-6 pm. por un hombre entrenado auxiliado por toros receladores (desviación de pene) en una relación toro\vaca de 1:25 (Pedroso y Roller, 2004). La inseminación se efectuó aplicando el método cervical profundo por un técnico experimentado, con una eficiencia técnica entre 50 y 55% en los últimos 4 años, usando semen congelado en pastillas de toros de fertilidad probada.

2.1.9.8: Análisis del riesgo relativo.

En los experimentos donde se realizó la determinación del riesgo relativo, el mismo se evaluó mediante la conformación de tablas de contingencia 2x2 (Thrusfield, 1999) y la aplicación de la prueba χ^2 utilizándose los paquetes estadísticos Epidat 3.1 y Win Episcope 2.0; se realizó un estudio de tipo prospectivo (cohorte), para un nivel de confianza del 95 % con hipótesis bilateral, analizándose la incidencia del anestro, la repetición de servicio y de trastornos reproductivos totales, de la siguiente forma:

Clasificación.	Enfermos.	No enfermos.	Total.
Expuestos.	a	b	(a+b)
No expuestos.	c	d	(c+d)
Total	(a+c)	(b+d)	(a+c) + (b+d)

La tasa de incidencia entre hembras hipocuprémicas (P_1) viene dada por:

$$P_1 = a/(a+b)$$

Y la tasa de incidencia entre hembras normocuprémicas (P_2) viene dada por:

$$P_2 = c/(c+d).$$

El riesgo relativo viene dado por:

$$RR = P_1/P_2$$

2.1.10: Criterios de inclusión y exclusión.

En todos los experimentos se utilizaron novillas y vacas, en etapa reproductiva, sin patologías en su aparato genital y clínicamente sanas, según examen clínico (Cuesta, 2003); excluyéndose aquellos animales que no cumplieron los requisitos de inclusión, además como criterio de salida se establecieron el sacrificio o muerte del animal, enfermedad crónica del aparato reproductor e incumplimiento de las indicaciones médicas preestablecidas.

2.1.11: Valoración económica preliminar.

Se realizó un estudio preliminar de la factibilidad económica del tratamiento con Cu parenteral, calculándose el costo de las materias primas que se necesitarían anualmente para el mismo por cada animal, el costo de oportunidad de la no aplicación de la terapéutica mencionada, el impacto económico del tratamiento a partir de los resultados alcanzados en el experimento 4 y el estimado de la aplicación de 50 mg de Cu a 1000 hembras bovinas.

2.1.12: Procesamiento de los resultados.

Los resultados obtenidos se procesaron a través de un paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5.0. Se realizaron comparaciones de proporciones, análisis de varianza y de regresión, así como la aplicación de algunas técnicas no paramétricas cuando los resultados así lo indicaron.

2.2: Experimento 1: Caracterización de la deficiencia de Cu y los indicadores reproductivos del bovino lechero en la zona centro sur de la provincia villa clara.

2.2.1: Introducción.

La deficiencia de Cu es la segunda carencia mineral en bovinos en pastoreo a nivel mundial (McDowell, 2003), en Cuba se ha reportado en esta especie distribuida por todo el país, conjuntamente con trastornos reproductivos de los rebaños estudiados (González *et al.*, 1988; García *et al.*, 2005); pero no se han realizado estudios sobre las concentraciones de Cu en el suelo, sobre los niveles de Cu en los pastos se han realizado pocos trabajos, fundamentalmente en la década del 80, por lo que hace necesario realizar un estudio integral para conocer y actualizar la incidencia de esta carencia mineral en el eje suelo-planta-animal de nuestras empresas ganaderas.

La caracterización de la hipocuprosis en una zona comprende los análisis del suelo y el pasto; así como las determinaciones de Cu en los animales para poder definir la magnitud real de esta carencia mineral (Arthington *et al.*, 2003; Lugton, 2004); la que constituye un problema de suma importancia, afectando los sistemas de producción, especialmente el comportamiento reproductivo de los animales adultos (Ballantine *et al.*, 2002).

Por tal razón este experimento tiene como objetivo evaluar el contenido de Cu en suelo, pastos, suero sanguíneo y tejido hepático de las hembras bovinas lecheras y los indicadores reproductivos en vaquerías de la zona centro sur de la provincia Villa Clara.

2.2.2: Materiales y Métodos.

Ubicación y características del área experimental.

El presente estudio se desarrolló en unidades de producción de la zona centro sur de la provincia de Villa Clara, la ubicación y la caracterización del clima de la zona y los animales de estos rebaños se describen en materiales y métodos generales.

Suelo del área experimental

En el área experimental predominan los suelos pardos con carbonatos, de rápida desecación, arcillosos y profundos sobre rocas calizas (Hernández y Pérez, 1975).

Estos suelos son equivalentes al grupo de los Cambisoles en el sistema de clasificación de suelos FAO-UNESCO (Hernández *et al.*, 2001). La profundidad promedio, hasta el contacto con la caliza,

es de 150 cm, los que presentan una baja densidad aparente, alta porosidad total y estructura granular media, condiciones estas que favorecen el buen desarrollo radical, la aireación y el movimiento del agua; la retención de esta es baja, lo cual puede acentuar los problemas derivados de la sequía estacional (Cairo y Fundora, 2005).

Procedimiento experimental.

Se utilizaron 4 unidades pecuarias representativas de la zona, 2 vaquerías y dos centros de novillas, donde se estudiaron las características de la composición mineral del suelo y el pasto.

En los rebaños de estas unidades se estudió el perfil mineral, seleccionando una muestra representativa de las diferentes categorías y estados productivos de los rebaños seleccionados (Álvarez, 2001), que comprendieron 140 animales, (40 vacas y 100 novillas), con un régimen de alimentación y manejo descrito en materiales y métodos generales; evaluándose los macroelementos: (Ca, P, Mg, Na y K) y los microelementos: (Cu, Zn y Fe.). Los criterios de inclusión y exclusión están descritos en materiales y métodos generales.

Se evaluaron las reservas hepáticas de Cu seleccionándose 15 animales con deficiencia sérica de Cu y 10 con normocupremia, estableciéndose la correlación entre los valores séricos y las concentraciones hepáticas de Cu de estos animales.

Se evaluó también la condición corporal, el comportamiento de los indicadores reproductivos y se realizó un diagnóstico de salud que incluyó el examen físico de los animales y la determinación de hemoglobina y hematocrito.

Toma de muestras y procedimientos analíticos.

Suelo.

Para la obtención de las muestras de suelo se siguieron los procedimientos descritos por Rodríguez (2000). Estas después de secadas al aire se pasaron por un tamiz con malla de 0.5 mm y se les determinó la materia orgánica mediante el método colorimétrico de Walkley y Black (citado por Jackson, 1970) y el pH por el método potenciométrico, según la NRAG 878/1987; el P_2O_5 y K_2O mediante fotolorimetría, por el método de Oniani (1964). En los cationes intercambiables, el contenido de N y K mediante las técnicas espectrometría de llama de la AOAC (1995); y el Ca y Mg mediante absorción atómica, por las técnicas de Paneque (1965). Los minerales trazas (Cu, Zn, Fe y Mn), se evaluaron por espectrofotometría de absorción atómica, según la NRAG 894/1988.

Pasto.

Las muestras de pasto fueron colectadas entre las 9 a.m. y las 12 m. en el estrato superior de la planta a 15 cm, según la NRAG 559/1982. Las mismas se enviaron al laboratorio, donde primeramente fueron colocadas en una estufa a 60 °C durante 72 horas y molidas. Los contenidos de Ca, Mg y K fueron determinados por las técnicas de espectrometría de llama recomendadas por la AOAC (1995). El fósforo se determinó mediante el método de Amaral (1972). Para la determinación de los minerales trazas (Cu, Zn, Fe, Mn), la ceniza se diluyó con 10 mL de CIH al 10% y se llevó a volumétrico de 100 ml enrasándose después con agua desionizada; evaluándose los mismos por espectrofotometría de absorción atómica (Miles *et al.*, 2001), en un equipo SP-9 de la firma PYE UNICAM según los procedimientos del fabricante.

Composición botánica.

Se determinó al inicio del experimento en cada época por el método propuesto por t'Mannetje y Haydock, (1963), realizándose 90 observaciones por hectárea; los resultados de esta evaluación pueden apreciarse en la tabla 2.2.1.

Tabla 2.2.1. Composición botánica (%) en 4 unidades de la zona centro sur de la provincia Villa Clara en el periodo lluvioso y poco lluvioso.

Especie	Periodo lluvioso	Periodo poco lluvioso
<i>Paspalum notatum</i>	18	13
<i>Dichanthium annulatum</i>	12	15
<i>Cynodon dactylum</i> cv común	2	0
<i>Panicum maximun</i> cv común	8	7
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	60	59
Área despoblada	0	6

Rendimiento de biomasa verde.

Se realizó por el método de Haydock y Shaw (1975), antes de la entrada de los animales al cuartón y posteriormente a su salida para determinar el consumo, de acuerdo al tiempo de ocupación de los cuartones. Para el cálculo del rendimiento se utilizó el paquete de programas ANALIT ver 3.0.

El balance alimentario se efectuó en cada zona empleando el CALRAC versión 1.0 (1996). Para el balance de los minerales (Mg, Cu, Zn, Fe y Mn), se consideraron los requerimientos establecidos para los mismos por la NRC (2001), calculándose las necesidades y el aporte de estos a partir del

consumo de materia seca estimado en el balance alimentario, sobre la base de estos se estableció la diferencia y el por ciento de los requerimientos.

Sangre, hígado e indicadores reproductivos.

Las muestras de sangre para los análisis hematoquímicos y las de hígado para las determinaciones de las concentraciones de Cu en el tejido hepático se tomaron y procesaron según las metodologías descritas en materiales y métodos generales, al igual que el sacrificio de los bovinos a los que se les tomaron muestras de hígado.

La condición corporal (C.C), y los principales indicadores reproductivos de estos rebaños se evaluaron según las metodologías descritas en materiales y métodos generales.

Determinación de las proporciones de valores patológicos.

Para determinar la proporción de animales con valores normales, sospechosos o patológicos en cada mineral en suero sanguíneo se tomaron en cuenta los criterios de Álvarez (2001), quien plantea como niveles críticos para cada variable estudiada los expuestos en la tabla 2.2.2.

Tabla 2.2.2: Niveles críticos de los minerales (Ca, P, Mg, Cu y Zn) establecidos para la especie bovina.

Variable	Factor de conversión	Niveles críticos	
		Sistema tradicional	Sistema internacional
Calcio	0.25	8 mg/100 ml.	2 mmol/L
Fósforo	0.324	5.3 mg/100 ml.	1.71 mmol/L
Magnesio	0.411	2 mg/100 ml.	0.82 mmol/L
Cobre	0.157	75 µg/100 ml.	11.77 µmol/L
Zinc	0.153	80 µg/100 ml.	12.24 µmol/L

Para las variables K, Na y Fe (tabla 2.2.3) se realizaron las estimaciones a partir de las medias de las muestras de las poblaciones estudiadas, calculando los límites críticos de estos minerales a partir de la ecuación siguiente: $\bar{x} \pm KSD$. La constante K se calculó en el caso de las novillas para 100 muestras y en el de las vacas para 40 muestras; promediando dichos intervalos se obtuvo valores para la misma de 2.233 y 2.379 para novillas y vacas respectivamente. El límite inferior de deficiencia se calculó aplicando la ecuación siguiente: $\bar{x} \pm 1.65 SD$, considerándose como normales o patológicos los valores superiores e inferiores respectivamente, según lo planteado por Álvarez (2001).

Tabla 2.2.3 Niveles críticos de los minerales (K, Na y Fe) calculados a partir de las medias de las poblaciones estudiadas.

Variable	Novillas.				Vacas			
	Media	SD	K	LC	Media	SD	K	LC
Potasio. (mmol/L)	4.60	0.39	2.233	3.73	4.52	0.37	2.379	3.64
Sodio. (mmol/L)	136.3	5.24	2.233	124.6	136.6	5.08	2.379	118
Hierro. (μmol/L)	18.31	2.88	2.233	11.88	23.77	3.11	2.379	16.37

Procesamiento estadístico.

Para los procesamientos estadísticos se empleó fundamentalmente el paquete estadístico STATGRAPHICS VER 5.0. Se calcularon los estadísticos descriptivos para todas las variables; en el pasto se realizó una comparación de las variables en las dos épocas del año y en el perfil mineral entre vacas y novillas, empleándose para esto un análisis de varianza de clasificación simple. Se realizó un análisis de correlación simple entre las concentraciones de Cu en suero sanguíneo y tejido hepático.

2.2.3: Resultados y discusión.

El resultado del análisis químico del suelo (tabla 2.2.4) ofreció valores de la materia orgánica de 5.69 ± 0.39 ; estos son considerados altos para este tipo de suelo (Cairo y Fundora, 2005) y son superiores a los reportados en otros trabajos (Vargas *et al.*, 2002 y Rodríguez *et al.*, 2006).

El pH se clasifica como neutro, con valores de 6.7 ± 0.24 , que están en correspondencia con otros estudios desarrollados sobre suelos pardos con carbonatos (Vargas *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006).

El P es uno de los elementos más deficitarios en los suelos ganaderos de Cuba (Crespo y Duran, 1990). Este estudio corrobora esta afirmación ya que los valores del P_2O_5 se clasifican de muy bajos y son similares para los reportados en otros estudios para este tipo de suelo (Noval, 2000; Vargas *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006). Valores similares se han reportado para el suelo ferralítico rojo (Hernández *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 2002). En cambio las concentraciones de K_2O son consideradas altas (Fundora y Yepis, 2000) y coinciden con otros estudios (Noval, 2000; Vargas *et al.*, 2002).

En el caso de los cationes intercambiables, las concentraciones del Ca se consideran deficientes; mientras el Mg, Na y K, se encuentran dentro de los parámetros normales (McDowell, 2005); Los

resultados obtenidos en el caso del Ca y el Mg son inferiores a los reportados en un estudio precedente en suelos no ganaderos (Alemán *et al.*, 2002), mientras que el Na y K coinciden con los reportados por estos autores.

Tabla 2.2.4: Caracterización ($\bar{x} \pm DE$) de la composición química del suelo en 4 unidades de la zona centro sur de la provincia de Villa Clara.

	Macroelementos*					
	P ₂ O ₅ mg/100g	K ₂ O mg/100g	Ca cmol/kg ⁻¹	Mg cmol/kg ⁻¹	Na cmol/kg ⁻¹	K cmol/kg ⁻¹
LC	15	10	24.5***	0,007 ***	0.70***	0.15***
Media	8.16	14.68	8.55	0.69	1.52	1.35
DE	2.41	1.01	2.04	0.12	0.46	0.44
Materia orgánica, pH y Microelementos*						
	MO %	pH	Cu ppm	Mn ppm	Zn ppm	Fe ppm
LC	< 5		0.6 ***	5 **	2 ***	2.5 **
Media	5.69	6.7	0.19	4.83	1.55	2.07
DE	0.39	0.24	0.02	0.39	0.40	0.41

* El numero de muestras para la zona es de n = 18.

Los niveles críticos de minerales en el suelo que son sugestivos de deficiencias son establecidos según los siguientes autores:

** Rhue y Kidder, (1983).

*** McDowell, (2005).

Se encontraron deficiencias en todos los microminerales estudiados; en el caso del Mn y el Fe el porcentajes de muestras deficientes fue de 66% y 61 % respectivamente, con valores inferiores a los niveles críticos de 5 ppm y 2.5 ppm (Rhue y Kidder, 1983). Mientras que los niveles de Zn eran inferiores a los niveles críticos de 2 ppm (McDowell, 2005). Los resultados obtenidos en el Mn y el Zn coinciden con los reportados en otros estudios en México (Gartenberg *et al.*, 1990); en la Florida (Espinoza *et al.*, 1991) y en Venezuela (Rojas *et al.*, 1993). Los valores del Fe difieren de los obtenidos por estos autores (Kalmbacher *et al.*, 2005).

La deficiencia micromineral más acentuada en el suelo fue la de Cu, con el 100% de las muestras de suelo por debajo del nivel crítico (Rhue y Kidder, 1983; McDowell, 2005). Resultados similares habían sido reportados en estudios desarrollados a principios de la década del 90, específicamente en el nordeste de México (Gartenberg *et al.*, 1990) y más recientemente en la Florida (Tiffany *et al.*, 2000); donde se diagnosticaron el 100% de las muestras de suelo deficientes en Cu.

En España, se ha reportado la deficiencia de Cu en el suelo de la región de Galicia, la que ha repercutido negativamente en los niveles de Cu del ganado que pasta en estas regiones (López-Alonso *et al.*, 2002).

Estos valores de Cu disminuidos en el suelo, unido a los altos niveles de materia orgánica, que lo antagonizan al formarse uniones muy fuertes entre ambos lo hacen no asimilable por la planta y por tanto no llega al animal, situación ésta observada con anterioridad (Arthington, 2003).

El análisis del pasto.

Las concentraciones de los minerales en el pasto (tabla 2.2.5), muestran que en el periodo lluvioso el 44 y 11 % de las muestras de pasto estaban deficientes en P y Ca respectivamente, mientras en el periodo poco lluvioso se diagnosticó el 31% de las muestras deficientes en P; pero no se apreciaron deficiencias de Ca, éste tuvo una diferencia significativa ($P < 0.05$) en los sus niveles a favor del periodo poco lluvioso. El 100 % de las muestras de Mg y K en ambos periodos estuvieron por encima de los niveles críticos establecidos.

En ambos periodos, los resultados de este estudio son coincidentes para en el Ca y el Mg y superiores en el caso del P y el K a los reportados en varias empresas de la región occidental de Cuba (Gutiérrez *et al.*, 2006).

Tabla 2.2.5: Composición mineral ($\bar{x} \pm DE$) del pasto en 4 unidades de la zona centro sur de Villa Clara.

Variables	LC* *	Periodos	
		Lluvioso*	Poco Lluvioso *
Ca %	< 0.30	0.45 ± 0.10 ^b	0.57 ± 0.07 ^a
P %	< 0.25	0.24 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.02 ^a
Mg %	< 0.20	0.23 ± 0.05 ^b	0.27 ± 0.02 ^a
K %	< 0.80	2.18 ± 0.30 ^a	2.27 ± 0.18 ^a
Cu ppm	< 10	4.98 ± 2.01 ^a	5.63 ± 1.20 ^a
Fe ppm	< 50	57.45 ± 8.89 ^a	54.41 ± 6.78 ^a
Zn ppm	< 30	33.57 ± 5.68 ^a	36.03 ± 2.39 ^a
Mn ppm	< 40	43.42 ± 6.68 ^a	41.44 ± 3.44 ^a

Valores promedios con letras no comunes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

* El numero de muestras para cada una de las épocas es de $n = 18$.

* * Los niveles críticos basaron en las siguiente referencias: NRC (2001 y McDowell *et al.*, 2005).

En el periodo lluvioso se apreció deficiencias de Mn y Zn en el 38 y 33% de las muestras analizadas respectivamente; en cambio, en el periodo poco lluvioso se detectó que en el 27% de casos existió deficiencia del primero, mientras el segundo se encontraba dentro de los parámetros normales. Los resultados obtenidos en estos dos minerales contrastan con los reportados en la Florida, donde las concentraciones de los mismos en el pasto se encontraban dentro de los parámetros normales de referencia (McDowell, 2000).

En el caso del Fe, en ambos periodos el 100 % de las muestras presentaron valores normales; la deficiencia férrica es rara debido a que los forrajes generalmente poseen un volumen adecuado de dicho mineral (McDowell *et al.*, 2005).

En los dos periodos el 100 % de las muestras de pastos estaban deficientes en Cu, con valores inferiores al límite crítico, con concentraciones superiores en el periodo seco, debido a la madurez de la planta. Las gramíneas tropicales presentan grandes variaciones en su contenido de Cu y contienen por termino medio de 5-8 ppm (MacPherson, 2000); los niveles de Cu obtenidos en este trabajo están en correspondencia con los reportados en otros estudios donde el contenido de este mineral en gramíneas tropicales ha fluctuado entre 3.5 y 6.2 (Mufarregue *et al.*, 1985; Mc Dowell y Valle, 2000; McBride y Cherney, 2004; Ndebele *et al.*, 2005).

Los resultados de este trabajo se corresponden además con los obtenidos en Cuba donde se han reportado el 100% de las muestras deficientes (González *et al.*, 1984; Vázquez, 1992); pero contrastan con los alcanzados en varias empresas de la zona occidental, donde los pastos presentaban adecuado contenido de Cu (Gutiérrez *et al.*, 2006).

Está demostrado que los pastos cuyo contenido de Cu fluctúa entre 3 y 5 ppm, como los reportados en este estudio, no cubren los requerimientos de este mineral en la especie bovina y pueden explicarse por la carencia del mismo en el suelo (Arthington y Brown. 2005), lo que se refleja en la estimación del balance de nutrientes en vacas y novillas (figuras 2.2.1 y 2.2.2), nótese que en el periodo lluvioso no se cubren los requerimientos de Cu, Zn y de PDIN, mientras que en el poco lluvioso existen insuficiencias de PDIN, PDIE, EM, Cu y Zn para ambas categorías de animales.

El comportamiento reproductivo de los animales es afectado por las deficiencias de energía (Butler, 2000 a b) y proteínas (López-Gatius *et al.*, 2001); los efectos de las carencias de estos principios inmediatos en el balance de nutrientes de hembras bovinas en pastoreo se han estudiado previamente en Cuba, demostrándose que la deficiencia proteica puede ser resuelta mediante el

establecimiento de sistemas silvopastoriles (Reinoso y Pino, 2003; Reinoso *et al.*, 2005; Vargas, 2008) y el déficit energético, mediante la suplementación con mieles de los animales; sin embargo, éstas alternativas no resuelven las carencias minerales de los animales, especialmente de Cu, por lo que son considerados el principal factor limitante de la productividad de los rebaños lecheros en nuestro país (Díaz *et al.*, 1998)

Figura 2.2.1: Estimación del consumo de nutrientes, expresado como porcentaje de los requerimientos en vacas y novillas, en el periodo lluvioso.

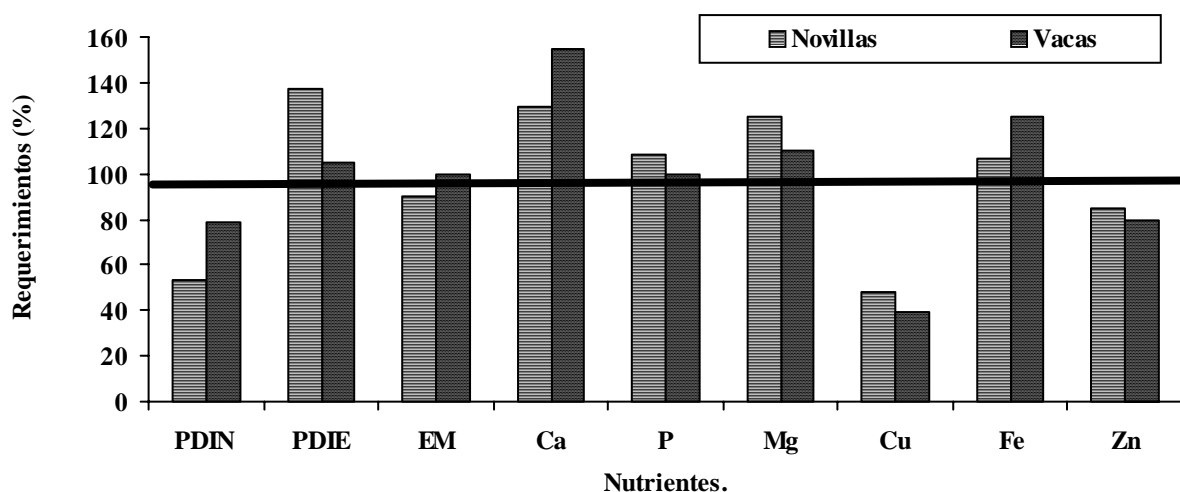
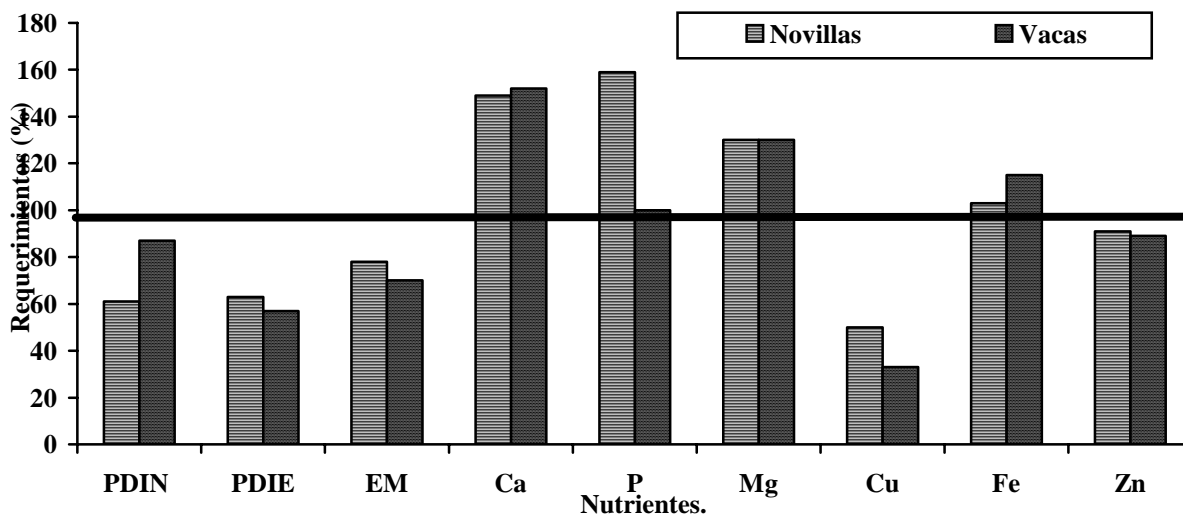


Figura 2.2.2: Estimación del consumo de nutrientes, expresado como porcentaje de los requerimientos en vacas y novillas, en el periodo poco lluvioso.



El resultados de la investigación del perfil mineral (tabla 2.2.6) muestra que los animales presentaban valores promedios de cupremia tanto en las vacas como en las novillas, inferiores a los 11.77 $\mu\text{mol/L}$, valor considerado el limite crítico de deficiencia para la especie (Álvarez, 2001; McDowell, 2005).

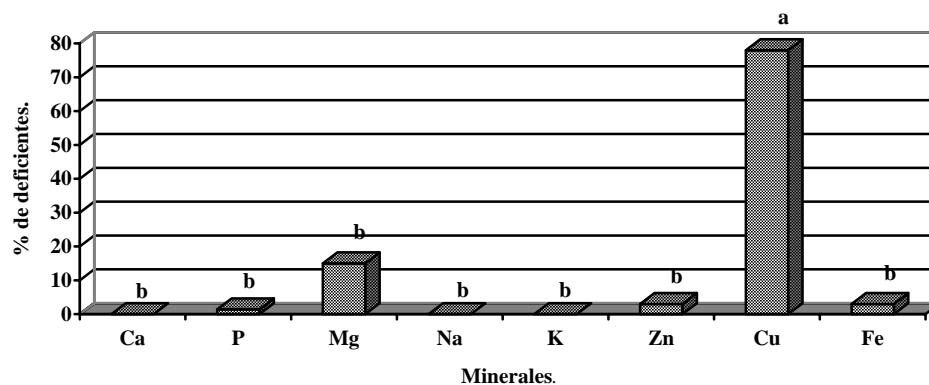
Tabla 2.2.6: Valores ($\bar{x} \pm \text{DE}$) de los parámetros hemoquímicos evaluados en las hembras bovinas investigadas de 4 unidades de la zona centro sur de la provincia de Villa Clara.

	Macroelementos (mmol/L)					Microelementos ($\mu\text{mol/L}$).		
	Ca	P	Mg	Na	K	Zn	Cu	Fe
Novillas.								
Media	2.43 ^a	1.99 ^a	0.90 ^a	136.3 ^a	4.60 ^a	14.73 ^a	11.17 ^a	18.31 ^b
DE	0.11	0.13	0.07	5.24	0.39	1.95	1.02	2.88
Vacas.								
Media	2.34 ^b	1.92 ^a	0.86 ^b	136.6 ^a	4.52 ^a	16.36 ^a	10.94 ^a	23.77 ^a
DE	0.12	0.21	0.06	5.08	0.37	2.42	1.35	3.11

Valores promedios con letras no comunes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se apreció que el mineral más deficiente en los animales fue el Cu ($p < 0.001$), siguiéndole el Mg, Zn y Fe (figura 2.2.3); resultados similares han sido obtenidos por otros autores en Cuba, donde la deficiencia de Cu se ha diagnosticado distribuida en todo el país (Fajardo *et al.*, 2000; Pedroso, 2002), especialmente en la región central donde su alta prevalencia ha sido demostrada en trabajos recientes (Gutiérrez, 2004; García y Cuesta, 2004; García *et al.*, 2005).

Figura 2.2.3: Porcentajes de animales con valores deficientes en suero sanguíneo de los minerales estudiados.



Columnas con letras no comunes indican diferencias significativas para ($P < 0.001$).

Los demás minerales (Ca, P, Mg, Na, Zn y Fe) se encuentran dentro de los parámetros fisiológicos de referencia para la especie (Radostits *et al.*, 2000), Tanto el Ca como el Mg en las novillas presentaron valores superiores ($P < 0.05$) a los de las vacas; lo que obedece a las pérdidas que tienen estas últimas durante la lactación (Álvarez, 2001). En cambio en las vacas se diagnosticaron valores de Fe superiores ($P < 0.05$) que en las novillas.

En otros países la carencia de Cu está ampliamente distribuida, un estudio conducido en México demostró que el 67% de los animales presentaba hipocupremia (Gartenberg *et al.*, 1990), resultados similares se reportaron en Argentina (Ramírez *et al.*, 1997; Cseh *et al.*, 1998). En Norteamérica, Europa y Asia la deficiencia de Cu ha sido reportada por varios autores (Dargatz *et al.*, 1999; Randhawa y Randhawa, 2002). Recientemente en la republica Checa se diagnosticó la deficiencia de Cu en el 28% de las vacas de leche, el 70% de los terneros, el 65% de las novillas y el 70% de toros (Pavlata *et al.*, 2005) y en el valle central de México, fundamentalmente en el periodo poco lluvioso (Morales *et al.*, 2007).

El estudio de las reservas hepáticas mostró valores promedio de Cu en tejido hepático de 74.22 ± 26.80 ppm; de los 25 animales estudiados el 60 % (15) presentaba hipocupremia y el 72 % (18), presentaba concentraciones de Cu hepático por debajo del nivel crítico de deficiencia de 75 ppm (Radostits *et al.*, 2000), que confirma la existencia de una alta incidencia de hipocuprosis en los rebaños estudiados.

Cuando se determinó en forma de porcentaje la proporción de animales considerando la relación entre las concentraciones de Cu hepático y sanguíneas, se encontró que el 70 % de los animales que tenían cupremias normales presentó bajos niveles de Cu hepático; de los animales hipocuprémicos el 73.3% mostró niveles bajos de Cu hepático y sólo el 30% del total de los animales que tuvo valores hepáticos óptimos presentaron valores normales en sangre.

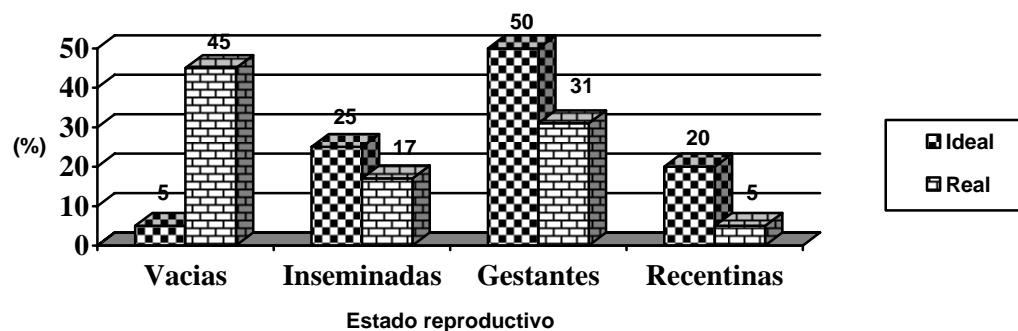
Los valores de Cu en tejido hepático obtenidos coinciden con los reportados en otros estudios en Cuba, donde se han diagnosticado bajas reservas del mineral en hígado, oscilando entre 25 ppm y 75 ppm en épocas de lluvia y sequía respectivamente (González *et al.*, 1984; Tarrero *et al.*, 1988).

No se encontró correlación ($r = 0.044$) entre los valores de Cu en suero sanguíneo y en el hígado, coincidiendo con otros investigadores (Vermunt y West, 1994; Quiroz *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2006).

Los indicadores reproductivos en las vacas (figura 2.2.4) mostraron que en el inicio del estudio los rebaños contaban con el 31 % de las vacas gestantes, un 5 % de recentinas, 17 % de inseminadas y

45 % de vacías como composición reproductiva, la que difiere de lo planteado por otros autores (Berry, 1997; Blanco, 1998, 2000) quienes expresan que los hatos lecheros debe tener más de un 50 % de las vacas gestantes, un 20 % de recentinas, 25 % de inseminadas y menos de 5 % de vacías.

Figura 2.2.4: Estado reproductivo de los rebaños estudiados en el momento de la evaluación en el año 2004.



La evaluación de los principales indicadores reproductivos de estos rebaños (tabla 2.2.7) mostró un deterioro de los mismos en las novillas, con una elevada edad a la incorporación, a la gestación y al primer parto de las mismas, contrastando con la reportada para estos indicadores en el Siboney de Cuba (Brito, 2001; Suárez *et al.*, 2001; Iglesias, 2004) y en novillas mestizas en Venezuela (González-Stagnaro *et al.*, 2006).

Tabla 2.2.7: Valores ($\bar{x} \pm DE$) de la Condición corporal y de los principales indicadores reproductivos evaluados.

	Indicadores reproductivos de las novillas en meses.					
	CC	EI	EG	IIG	EP	IIP
Media	3.3	32.11	41.06	8.84	50.05	18
DE	0.47	3.81	4.46	2.07	4.48	2.42
Indicadores reproductivos de las vacas en días.						
	CC	IPPI	PS	IPP	II	
Media	2.97	163.9	222.06	503.17	2.38	
DE	0.52	42.0	58.24	56.29	0.71	

En las vacas la situación no es menos desfavorable; tanto el IPPI, PS e IPP observados fueron demasiado largos, atendiendo a los parámetros de referencia para el bovino lechero en condiciones ideales de explotación expuestos por otros autores (Wattiaux, 1996; Álvarez, 1997; Howard, 1997), que plantean como óptimos 60 a 70 días; 85 a 90 días y 365 a 395 días para cada uno de ellos;

además el índice de inseminación pueden ser evaluado de malo (Fetrow *et al.*, 1997; Blanco, 2000). También los indicadores reproductivos evaluados en este trabajo son menos eficientes que los reportados para el genotipo racial Siboney de Cuba, en sistemas de silvopastoreo (Reinoso, 2000; Reinoso y Pino, 2003; Reinoso *et al.*, 2005)

El concepto de que el factor más limitante es el que dicta la productividad (McDowell, 2005), permite afirmar, según los resultados de este experimento, que los indicadores anteriores son el reflejo de la interacción existente entre los bajos niveles de Cu en el suelo, que provocan la deficiencia del mineral en el pasto, repercutiendo en el estado mineral de los animales, provocando la hipocupremia diagnosticada en los animales trayendo consigo las alteraciones reproductivas encontradas. Por otra parte son varios los reportes de la asociación de la hipocuprosis con el bajo desempeño reproductivo de los animales (Quintela *et al.*, 1997; Loste *et al.*, 2001).

2.2.4: Conclusiones.

Se demostró que en las unidades ganaderas de la zona centro sur de la provincia Villa Clara existe deficiencia de Cu en el 100% de las muestras de suelo y pasto, el 75% de las muestras de suero sanguíneo y el 72% de las de tejido hepático, así como un marcado deterioro de los indicadores reproductivos de los rebaños estudiados.

Experimento 2: Efecto de la aplicación parenteral de diferentes dosis de Cu sobre la dinámica de las concentraciones séricas y hepáticas, actividad enzimática y la residualidad en leche.

2.3.1: Introducción.

El experimento uno demostró la alta incidencia de la deficiencia de Cu en la zona estudiada, lo que indica la necesidad de desarrollar estrategias de suplementación del mineral; en el mundo se han venido utilizando para este fin, de manera masiva en áreas afectadas las sales inyectables de Cu (Fazzio *et al.*, 2003). Estos fármacos poseen alta eficacia, evitan los efectos negativos de los antagonistas en el tracto digestivo (Van Niekerk *et al.*, 1994) y proporcionan los niveles adecuados de Cu en los animales, sobre todo en los momentos de mayores demandas como son la producción y la reproducción (Gee *et al.*, 2000; Smith, 2003).

Los compuestos de Cu pueden provocar intoxicaciones agudas, ya que éstos tienen un margen de seguridad relativamente bajo, particularmente en terneros y animales jóvenes (Goldfrank *et al.*, 1998; EMEA, 1998); por otra parte, la presencia del Cu en los productos lácteos, constituye un tema de actualidad debido a la contaminación de la cadena trófica involucrada y a los daños que ocasionan a la salud pública, pudiendo ser muy tóxico concentraciones altas (Mubbasher *et al.*, 2003).

Sin embargo, aunque existen reportes de casos de intoxicación cúprica por estos compuestos inyectables, no existen en la literatura estudios de forma controlada sobre los efectos tóxicos y residuales de la administración de los mismos en la especie bovina.

Por lo que nos proponemos como objetivo determinar la dosis parenteral de Cu que restablezca las concentraciones séricas y hepáticas en animales hipocuprémicos sin provocar efectos tóxicos sobre el hígado ni residualidad en la leche.

2.3.2: Materiales y Métodos.

Se utilizaron 45 vacas del genotipo racial Siboney de Cuba con deficiencia sérica de Cu ($< 11.77 \mu\text{mol/L}$), una CC entre 3 y 4, clínicamente sanas, según diagnóstico clínico practicado previamente que incluyó además análisis complementarios como la determinación de hemoglobina, hematocrito y estudios coprológicos para diagnosticar la presencia o no de parásitos, especialmente el trematodo *Fasciola hepatica*; los criterios de inclusión y exclusión están descritos en materiales y métodos generales.

En la primera etapa se utilizaron 20 animales en producción láctea, con una edad promedio entre 6 y 7 años, entre segunda y tercera lactancia y 90 - 120 días de lactación con una producción promedio de $5.2 \text{ L vaca}^{-1} \text{ día}^{-1}$, divididos en cuatro grupos de tratamientos de 5 vacas cada uno; que recibieron 25, 50 y 100 mg de Cu, además de un grupo utilizado como control sin suplementación cúprica, con los cuales se realizó una dinámica de la cupremia antes y cada 5 días posterior al tratamiento durante dos meses, determinándose la máxima concentración sérica de Cu y el tiempo de declinación de estos valores. A los 60 días se realizó un muestreo final, para determinar la aparición o no de hipocupremia dentro de este periodo. En las vacas donde se aplicaron 100 mg de Cu se realizó un estudio en dinámica durante un mes sobre la residualidad de este elemento en leche.

En la segunda etapa se utilizaron 25 animales destinados al sacrificio por baja producción láctea, con una edad promedio de 6 años, divididos en 5 grupos experimentales de 5 vacas cada uno; evaluándose la influencia del suministro de 25, 50, 100 y 200 mg de Cu, sobre las reservas y enzimas hepáticas; utilizándose además un grupo control, sin suplementación con Cu. Para determinar las concentraciones de Cu en hígado de cada grupo de tratamiento se sacrificaron los animales a los 5 días de aplicado el producto, coincidiendo con el pico de cupremia determinado en la etapa anterior. Previo al sacrificio de los mismos se les tomó muestras de sangre para determinar las enzimas hepáticas.

Posterior a la administración se realizaron exploraciones clínicas frecuentes y continuas (cada 12 horas) hasta el sacrificio de los animales e incluyeron el estado general del animal, de la piel, las mucosas, y los demás eventos clínicos para diagnosticar manifestaciones de intoxicación cúprica.

Toma de muestras y procedimientos analíticos.

La toma de muestras de sangre e hígado, las determinaciones de Cu en las mismas y el sacrificio de los animales se realizaron según las metodologías descritas en materiales y métodos generales.

La toma de muestras de leche se efectuó según las norma ISO 707 (1997), en tubos de ensayos esterilizados y desmineralizados; en ninguna parte del proceso de colecta y análisis se utilizaran instrumentos metálicos. Las determinaciones de Cu en la leche se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica en un equipo SP-9 de la firma PYE UNICAM, según los procedimientos del fabricante. El procedimiento seguido en la preparación de las muestras fue el recomendado por Miles *et al.* (2001).

Para las determinaciones enzimáticas y de la Bilirrubina las muestras de sangre fueron trasladadas al laboratorio inmediatamente después de extraídas. Se efectuaron las determinaciones de la Bilirrubina total (BT), Bilirrubina directa (BD), Bilirrubina indirecta (BI) y las enzimas Alanino-Amino-Transaminasa, (ALAT); Aspartato-Amino-Tranferasa, (ASAT), la Fosfatasa Alcalina (ALP) y la Glutamato deshidrogenasa, (GLDH) por el método cinético U V, optimizado IFCC; en todos los casos en un equipo computarizado AIRONE 200, de la firma CRONY INSTRUMENTS, según los procedimientos descritos por el fabricante. Para el control de reproducibilidad se empleó el patrón ELITROL-I, lote R60148 fabricado por la firma ELTECH.

Procesamiento estadístico de los resultados.

Se empleó fundamentalmente el paquete estadístico STATGRAPHICS VER 5.0. Se calcularon los estadísticos descriptivos para todas las variables; en los diferentes momentos en que fueron evaluadas las dosis de Cu durante la dinámica del mismo en sangre, las concentraciones del microelemento en el hígado y los valores de las enzimas hepáticas empleándose un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), previa comprobación de los supuestos de base, aplicándose la prueba LSD para la comparación de las medias. Se realizó un análisis de regresión y correlación lineal simple en la dinámica de la cupremia en función del tiempo, así como entre las dosis de Cu aplicadas y las concentraciones de Cu en suero sanguíneo y tejido hepático.

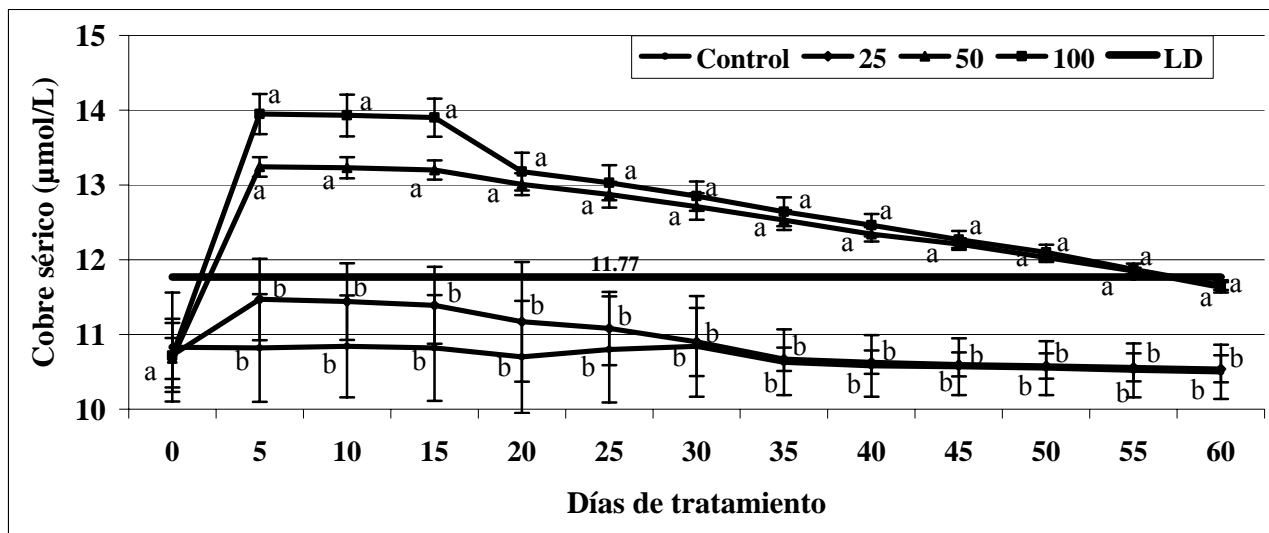
2.3.3: Resultados y Discusión.

La dinámica del Cu en suero sanguíneo de los animales en estudio (figura 2.3.1) mostró durante todo el experimento en el grupo control valores hipocuprémicos. En los animales tratados con 25 mg de Cu, la cupremia alcanzan sus valores máximos a los 5 días post tratamiento, aunque son inferiores a los 11.77 $\mu\text{mol/L}$, límite inferior de los parámetros fisiológicos de referencia e indicativo de hipocupremia (Álvarez, 2001; McDowel, 2005), sin diferencias estadísticas entre las concentraciones de Cu séricas de los mismos y los utilizados como controles, lo que indica que esta dosis resulta insuficiente para restablecer los niveles de Cu séricos.

En los grupos tratados con 50 y 100 mg de Cu se incrementaron las concentraciones de este microelemento en suero sanguíneo hasta alcanzar los valores fisiológicos de la especie bovina sugeridos por los autores citados anteriormente, alcanzándose el pico máximo de cupremia a los 5

días post tratamiento, sin diferencias estadísticas entre estas dosis, que difieren ($p < 0.05$) en todos los momentos de los tratados con 25 mg y los controles.

Figura 2.3.1: Dinámica de los valores de Cu en suero sanguíneo de animales tratados con diferentes dosis de Cu por vía parenteral.

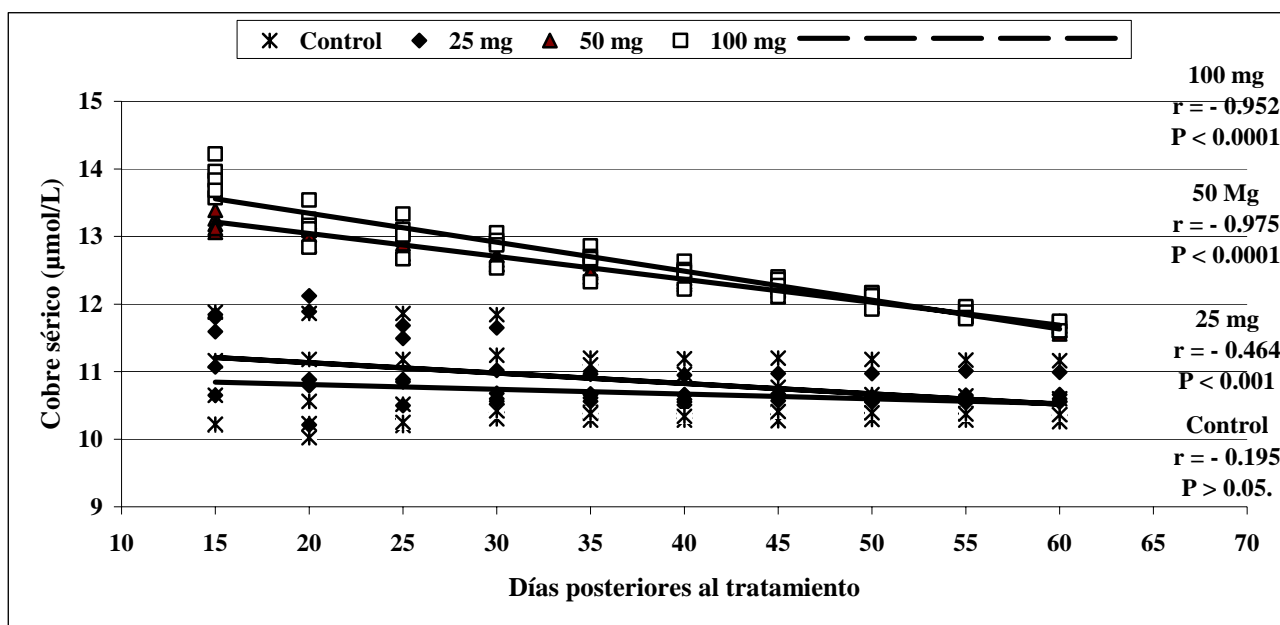


Valores promedios con letras no comunes entre las series en el mismo día de muestreo indican diferencias significativas para ($P < 0.05$)

Posterior al pico máximo, la cupremia se estabiliza y comienza a descender a partir del día 15, encontrándose desde este momento un decrecimiento altamente significativo ($p < 0.0001$) en los valores de Cu séricos en la medida que transcurren los días posteriores al tratamiento en las dosis de 50 ($r = - 0.975$) y 100 mg ($r = - 0.952$). Situación similar se verificó en el grupo tratado con 25 mg de Cu aunque menos significativo ($p < 0.01$) y ($r = - 0.511$). En el grupo control no se apreciaron descensos significativos de los valores de Cu en suero sanguíneo al transcurrir los días del estudio (figura 2.3.2).

A los 55 días posteriores al tratamiento en los animales que recibieron 50 y 100 mg de Cu, los valores de este elemento en suero sanguíneo se encontraban dentro de los parámetros fisiológicos para la especie. Sin embargo, como consecuencia del decrecimiento experimentado a los 60 días se encontraron cupremias de 10.54, 10.67, 11.63 y 11.66 $\mu\text{mol/L}$, en los grupos tratados con 0, 25, 50 y 100 mg respectivamente.

Figura 2.3.2: Correlación entre los valores de Cu en suero sanguíneo en las diferentes dosis de cobre aplicadas y el tiempo transcurrido posterior al tratamiento entre los días 15 y 60 del estudio.



El ritmo de descenso promedio de la cupremia en cada muestreo fue en el grupo tratado con 50 mg de 0.17 $\mu\text{mol/L}$, mientras que en el grupo que recibió 100 mg fue de 0.24 $\mu\text{mol/L}$. Estos resultados demuestran, por un lado la eficacia del tratamiento aplicado para incrementar las concentraciones de Cu en sangre y por otro, que a partir de los 60 días ya estos valores se vuelven de nuevo hipocuprémicos lo que nos posibilita repetir la cuproterapia parenteral a partir de este momento.

Se encontró correlación positiva y significativa ($P < 0.05$); entre la dosis de Cu inyectada y las concentraciones de Cu en el suero sanguíneo al quinto día post tratamiento ($r = 0.90$ y $R^2 = 0.81$), coincidiendo con el pico de cupremia en los animales y al decimoquinto día ($r = 0.89$ y $R^2 = 0.80$), momento en que comienzan a declinar las mismas, lo que demuestra que a medida que se incrementó la dosis de Cu administrada, se produjo un incremento significativo en las concentraciones de este microelemento en sangre (figuras 2.3.3 y 2.3.4).

Figura 2.3.3: Correlación entre la dosis aplicada y las concentraciones de Cu en suero sanguíneo al quinto día post tratamiento.

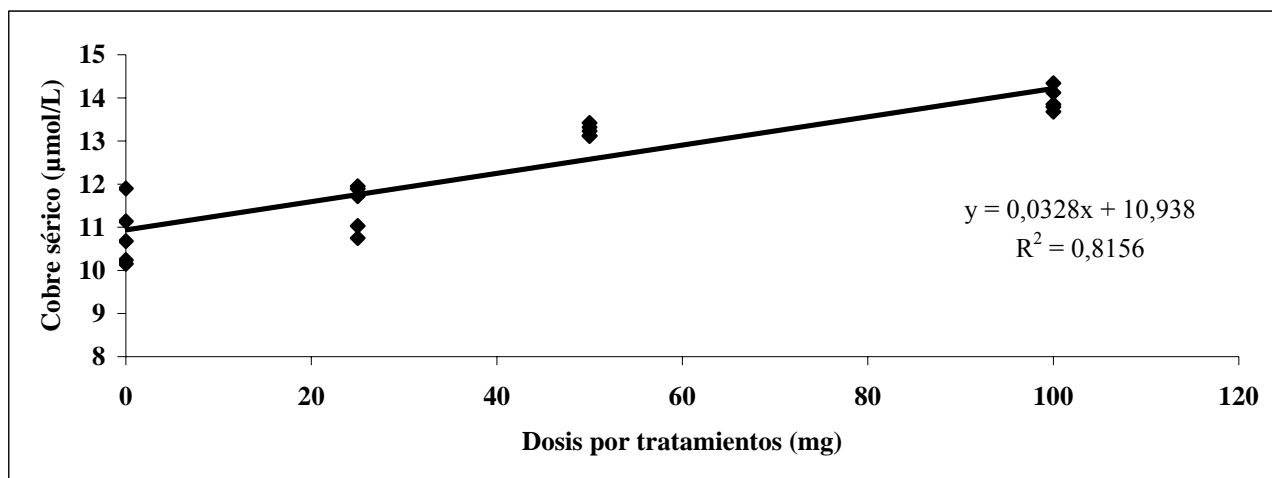
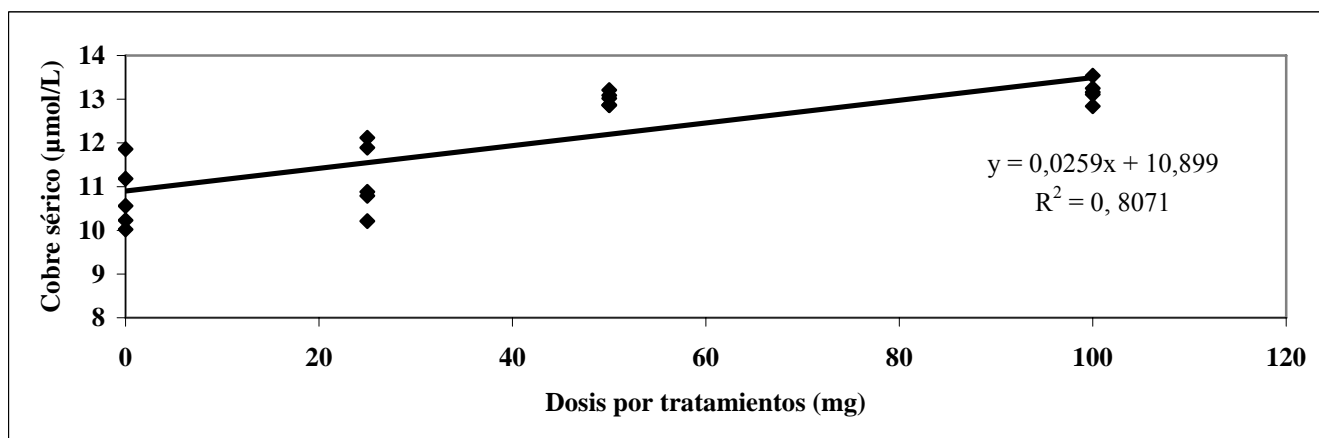


Figura 2.3.4: Correlación entre la dosis aplicada y las concentraciones de Cu en suero sanguíneo al decimoquinto día post tratamiento.



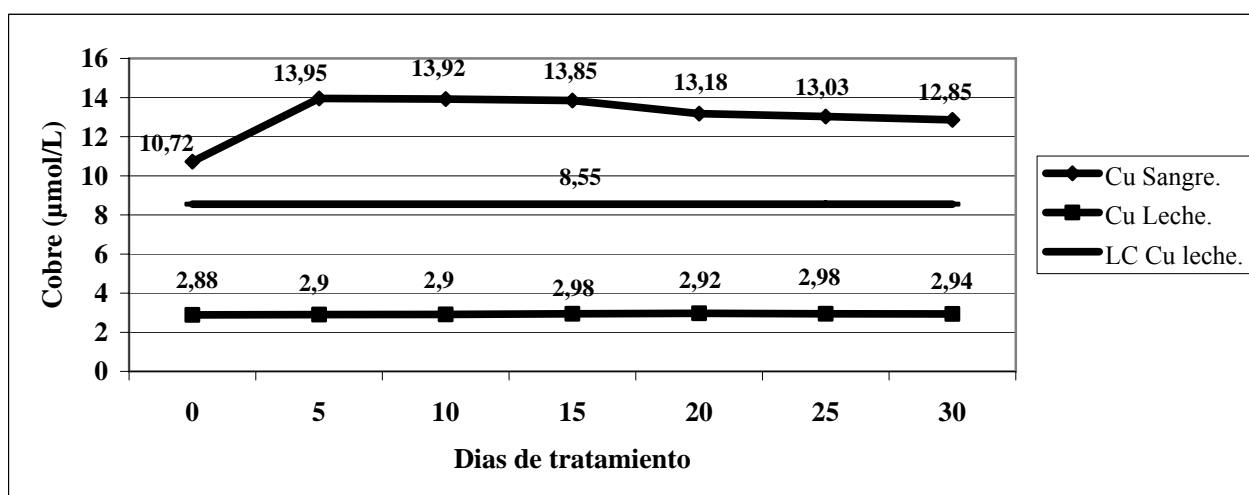
Los resultados alcanzados en este trabajo están en correspondencia con los obtenidos en estudios anteriores, donde la administración de 125 mg de Cu en las vacas, repitiendo el tratamiento a los tres meses; aumentó ($P < 0,01$) las concentraciones de Cu en suero sanguíneo (Balbuena *et al.*, 1999 y Castelli *et al.*, 2001). En Cuba, con la administración de Cu por vía parenteral en vacas gestantes, se incrementaron ($P < 0.001$) las concentraciones de Cu en suero sanguíneo (García *et al.*, 2007).

La dinámica de las concentraciones promedio de Cu en suero sanguíneo y en la leche de los animales tratados con 100 mg de Cu por vía parenteral (figura 2.3.5) mostró que aún cuando los

valores de la cupremia aumentaron de manera significativa, las concentraciones del Cu en leche no se incrementan; encontrándose éstas dentro de los parámetros normales de referencia para la especie bovina de 2.8 - 3.2 $\mu\text{mol/L}$ (Grace y Wilson, 2002); por lo cual, se cumple con la norma que establece en 8.55 $\mu\text{mol/L}$ los límites máximos tolerables establecida por otros autores (Muntean *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005). Estos son los primeros reportes sobre el contenido de Cu en la leche bovina en Cuba, lo que constituye un aporte de este trabajo en el ámbito nacional.

Este estudio no demostró relación entre las concentraciones Cu en sangre y en la leche ($r = 0.035$), estando en correspondencia con un trabajo precedente donde no se apreció correlación entre las concentraciones de Cu en suero sanguíneo y en el calostro de las vacas (Pavlata *et al.*, 2004).

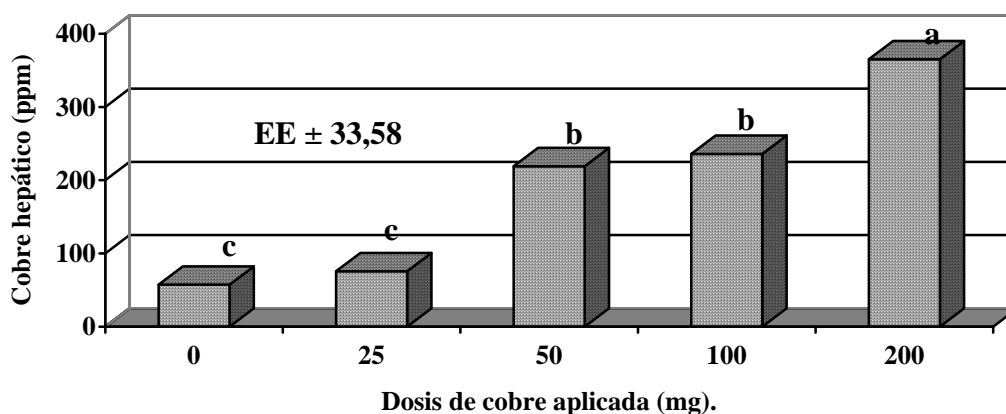
Figura 2.3.5: Dinámica de los valores de Cu en el suero sanguíneo y la leche de vacas tratadas con 100 mg de Cu por vía parenteral.



El curso de la intoxicación posterior al tratamiento parenteral del Cu es hiperagudo, con la posibilidad de que aparezca la sintomatología clínica de la misma (Fazzio *et al.*, 2003); sin embargo, la administración única de diferentes concentraciones Cu por vía subcutánea, no provocó manifestaciones clínicas de toxicidad en los animales dentro de los 4 días posteriores al tratamiento o periodo de observación, efectuado mediante las exploraciones clínicas frecuentes y continuas, lo que fue confirmado por los hallazgos macroscópicos de la necropsia (anexo 10), al no observarse las lesiones características de esta intoxicación señaladas por Jubb y Kennedy, (2007).

Las concentraciones de Cu en el hígado (figura 2.3.6) no muestran diferencias estadísticas entre el grupo control y el tratado con 25 mg de Cu, evidenciando el estado de hipocuprosis de los animales utilizados como testigos y que 25 mg resultan insuficientes para restablecer su concentración en el órgano de reserva, encontrándose diferencias ($p < 0.05$) entre los valores obtenidos en los mismos y los alcanzados en los restantes grupos (50 y 100 mg de Cu), con los que se logran incrementar los valores de Cu en el tejido hepático hasta los niveles normales para la especie bovina (Radostits *et al.*, 2000), sin diferencias entre ellos.

Figura 2.3.6: Comportamiento de las concentraciones de Cu en tejido hepático de animales tratados con diferentes dosis de una formulación inyectable de CuSO_4 .

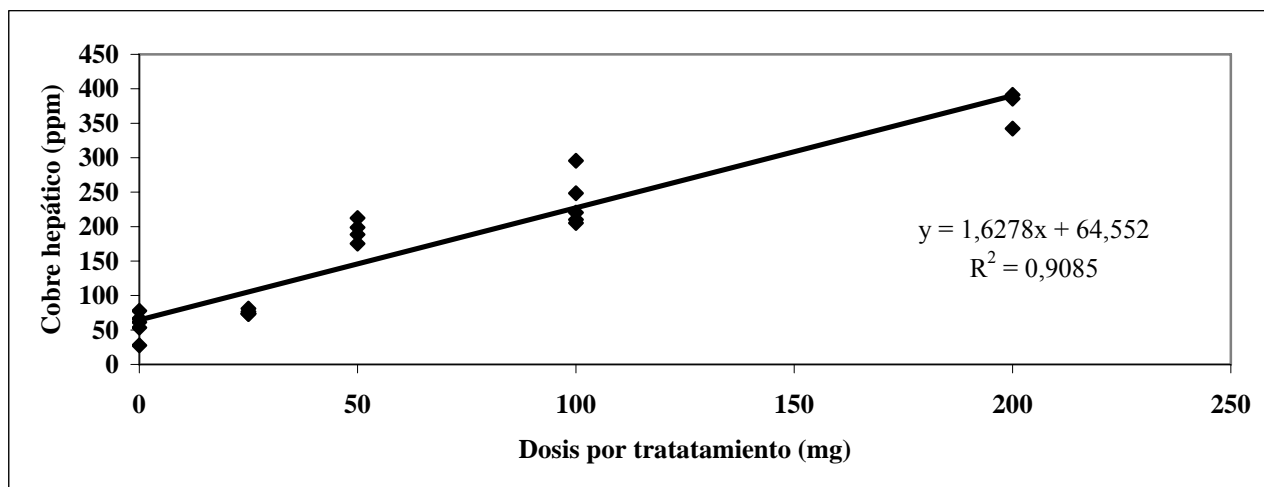


Columnas con letras no comunes indican diferencias significativas para ($P < 0.05$).

En el grupo tratado con 200 mg los tenores de Cu en tejido hepático ascendieron hasta 365.15 ppm, valor que también está dentro de los parámetros establecidos por los autores citados anteriormente y muy inferior a las 600 ppm, valor indicativo de intoxicación (Miranda *et al.*, 2000); esto puede deberse a que cuando se incrementan los depósitos hepáticos de Cu por la aplicación de inyecciones del mismo, se produce una mayor síntesis de Cp, que ayuda a mantener la concentración requerida, al transportar la parte excedente desde la célula hepática hacia otros tejidos (López-Alonso *et al.*, 2005).

Estos resultados corroboran los alcanzados en estudios anteriores donde la aplicación de Cu parenteralmente incrementó las reservas hepáticas del mismo en los animales tratados, las que se mantuvieron elevadas aún después de transcurridos 90 días de la aplicación (Quiroga *et al.*, 1995). En el experimento se encontró una correlación positiva ($P < 0.05$) entre la dosis inyectada y las concentraciones de Cu en hígado ($r = 0.95$ y $R^2 = 0.90$, que indica que en la medida que se incrementó la dosis de Cu administrada, se produjo un incremento significativo de sus concentraciones en tejido hepático (Figura 2.3.7); contrastando con lo planteado por otros autores (Bulgin *et al.*, 1986).

Figura 2.3.7: Correlación entre la dosis aplicada y las concentraciones de Cu en tejido hepático.



Los resultados comparativos entre los grupos estudiados y tratados con diferentes dosis de Cu (tabla 2.3.1) no mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellos para las enzimas ASAT, ALAT, GLDH y ALP; las que se encuentran dentro de los parámetros fisiológicos para la especie (Kaneko *et al.*, 2002), y son similares a los reportados para algunas razas bovinas pertenecientes a la especie *B. taurus* en condiciones tropicales (Villa *et al.*, 1999; Lago *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2007).

Tabla 2.3.1: Comportamiento de las concentraciones de las enzimas hepáticas ($\bar{x} \pm EE$) de animales tratados con diferentes dosis de una formulación inyectable de CuSO_4 .

Dosis	n	ALAT (UI/L)	ASAT (UI/L)	GLDH (UI/L)	ALP (UI/L)
0 mg.	5	38.92 \pm 2.36	69.34 \pm 7.10	4.07 \pm 0.17	143.66 \pm 13.19
25 mg.	5	39.18 \pm 0.78	65.06 \pm 2.45	4.07 \pm 0.04	138.62 \pm 7.33
50 mg.	5	39.94 \pm 2.72	77.31 \pm 7.78	4.13 \pm 0.12	150.22 \pm 14.26
100 mg.	5	38.16 \pm 1.79	73.23 \pm 3.38	4.14 \pm 0.07	142.73 \pm 15.26
200 mg.	5	38.4 \pm 1.84	73.75 \pm 2.35	4.13 \pm 0.07	145.09 \pm 6.15

Los niveles en suero sanguíneo para las enzimas ASAT y ALAP en este trabajo, son muy superiores a los reportados por varios autores en nuestro país en la década del 80, las diferencias pueden estar dadas por la raza y los sistemas de alimentación; algunos de ellos desarrollaron sus investigaciones en vacas holstein (Margolles *et al.*, 1987 b; Zaldivar *et al.*, 1989) y otros en ganado cebú (Colomé *et al.*, 1989), que en todos los casos eran alimentadas con altas cantidades de concentrados en sus raciones. En un estudio para evaluar el funcionamiento hepático, en 7 razas especializadas en la producción de leche en condiciones tropicales se demostró que las vacas holstein mostraron los menores valores ($P < 0.05$) para estas enzimas (Campos *et al.*, 2007)

Por otra parte los autores mencionados realizaron las determinaciones utilizando un método colorimétrico y todo el procedimiento manual, en este estudio se empleó una metodología diferente, más moderna (método cinético U V optimizado por la IFCC) y los procedimientos son completamente automatizados, lo que sin dudas debe haber influido en los resultados.

Los valores obtenidos en la bilirrubina, otro importante indicador de funcionamiento hepático (tabla 2.2.2), se encuentran dentro de los parámetros fisiológicos para la especie bovina (Kaneko *et al.*, 2002); sin diferencias estadísticas significativas entre los animales tratados con diferentes dosis de Cu. Resultados similares han sido reportados para en bovino lechero en el trópico (Campos *et al.*, 2007).

Tabla 2.3.2: Valores de las Bilirrubinas ($\bar{x} \pm EE$) de animales tratados con diferentes dosis de una formulación inyectable de CuSO₄.

Dosis	BT ($\mu\text{mol/L}$).	BD ($\mu\text{mol/L}$).	BI ($\mu\text{mol/L}$).
0 mg.	10.40 \pm 1.19	4.56 \pm 0.35	5.84 \pm 1.04
25 mg.	10.42 \pm 0.42	4.63 \pm 0.31	5.76 \pm 0.63
50 mg.	10.41 \pm 0.39	4.80 \pm 0.30	5.45 \pm 0.49
100 mg.	10.88 \pm 0.60	4.36 \pm 0.21	6.53 \pm 0.60
200 mg.	10.34 \pm 0.27	4.74 \pm 0.28	5.60 \pm 0.36

Los resultados de las determinaciones de las enzimas hepáticas y la bilirrubina, permiten afirmar que las concentraciones de Cu empleadas no provocan alteraciones del funcionamiento hepático, permitiendo descartar afecciones agudas del órgano posteriores a la administración del producto. El hígado es vulnerable a la intoxicación aguda con Cu, aproximadamente en 24 horas las tres cuartas partes del Cu disponible ingresa al mismo; este rápido ingreso provoca los síntomas de toxicidad, daños hepáticos caracterizados por alteraciones enzimáticas del órgano e incluso la necrosis hepática severa (Atkinson *et al.*, 2004).

La intoxicación aguda por Cu en ovinos posterior a la administración parenteral de compuestos de Cu se acompañó por un aumento de la fosfatasa alcalina (ALP) y las bilirrubina total y directa (Uzal *et al.*, 1992; Robles *et al.*, 1993); en ovinos alimentados con camas de pollos con alto contenido de Cu se diagnosticaron valores elevados de la ALAT y ASAT, evidenciando alteraciones marcadas en el tejido hepático (Cantón Castillo *et al.*, 1994; Vivas, 2002).

El consumo por tiempo prolongado (7 meses) de elevados niveles de gallinaza en la dieta, con alto contenido de Cu aumentó los valores de la ASAT, ALAT y las Bilirrubinas por encima de los valores normales de referencia para la especie y provocó necrosis hepática leve y moderada (Pérez, 2004).

2.3.4: Conclusiones.

Las dosis de 50 y 100 mg de Cu por vía parenteral son eficaces para restaurar las concentraciones de Cu en suero sanguíneo durante 60 días y en tejido hepático en los animales tratados hasta los valores de referencia para la especie bovina, sin presentar efectos tóxicos ni residuales.

2.4: Experimento 3: Estudio de la relación entre los valores de la cupremia y los indicadores reproductivos de la hembra bovina.

2.4.1: Introducción.

En nuestro país los rebaños bovinos se caracterizan por presentar diferentes trastornos reproductivos, entre los que caben destacar, la baja tasa de concepción al primer servicio con elevado número de servicios por concepción, elevados intervalos parto concepción y parto-parto, así como una alta incidencia de estros perdidos y de anestros; situación que fue corroborada en el primer experimento de este trabajo. Estos problemas son una de las principales causas de infertilidad y provocan un retraso en el próximo ciclo reproductivo (Stevenson *et al.*, 2000).

Se han señalado como los factores de riesgo más importantes a presentar trastornos reproductivos a los problemas postpartum (Grohn y Rajala-Schultz, 2000; Chebel *et al.*, 2004), inadecuados programas de manejos y alimentación que conducen a un deficiente aporte de energía (Landau *et al.*, 2000), deficiencia proteica (López-Gatius *et al.*, 2001) y las deficiencias minerales, especialmente la de Cu (Pedroso y Roller, 1997; Córdova *et al.*, 2002; Pedroso, 2005).

Sin embargo, la deficiencia de Cu como factor de riesgo para los trastornos reproductivos no ha sido revaluada en rebaños comerciales; desconociéndose el grado de relación entre la cupremia y los indicadores reproductivos de la hembra bovina lechera y en que niveles de la misma se establece dicha asociación, al no haber sido científicamente probada.

Por ello el objetivo de este experimento es demostrar si existe correlación entre los valores de la cupremia y los indicadores reproductivos de las hembras bovinas con cupremia espontánea e inducida.

2.4.2: Materiales y Métodos.

Diseño experimental.

Este experimento se desarrolló en el periodo lluvioso (Junio-Noviembre), con animales procedentes de 3 centros de novillas y 5 vaquerías de la zona de estudio, todos bajo las mismas condiciones de alimentación y otros factores de manejo. El estudio se dividió en dos partes o etapas; en la primera se realizó la evaluación espontánea y en la segunda, de forma experimental, valorándose la relación entre los niveles de Cu séricos y los indicadores reproductivos en la hembra bovina.

En la espontánea se realizó un estudio de riesgo relativo de padecer los trastornos reproductivos siguientes: anestro, repetición de servicio y problemas reproductivos totales (la sumatoria de ambos) en animales hipocuprémicos; el mismo involucró a 239 hembras bovinas lecheras de los rebaños mencionados. Las consideraciones sobre hembras cíclicas, anéstricas y repetidoras del servicio fueron descritas en materiales y métodos generales.

Además, se seleccionaron de manera aleatoria y utilizaron 100 novillas y 40 vacas de los rebaños estudiados, evaluándose los niveles séricos de Cu y los indicadores reproductivos siguientes: EI, IIG, IIP y la EP, todos ellos en las novillas y en las vacas, el IPPI, PS, IPP e II, estableciéndose la correlación entre estos y los valores de la cupremia.

En la etapa experimental se procedió a evaluar la relación entre los niveles de Cu séricos y los indicadores reproductivos citados anteriormente, además de los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones. Para esto, se diagnosticaron y estudiaron 80 vacas con deficiencia sérica de Cu, con una edad comprendida entre 6 y 7 años, una CC entre 3 y 4 y un período de espera voluntaria (PEV) de 60 días.

Las vacas se dividieron y conformaron 4 grupos experimentales y homogéneos, de 20 animales cada uno, que fueron tratados con una formulación de CuSO_4 (2.5%), inyectada subcutáneamente, repitiendo dicha inyección cada dos meses hasta completar tres aplicaciones, en dosis de 25, 50 y 100 mg de Cu, utilizándose además un grupo control; se evaluó el efecto de la suplementación cúprica sobre los niveles séricos (evaluados al inicio y a los 30 días del último tratamiento) y los indicadores reproductivos, estableciéndose las correlaciones entre la cupremia después del tratamiento y estos indicadores.

Las metodologías para la detección del celo e inseminación artificial, los análisis de riesgo relativo, la toma de muestras de sangre, las determinaciones de Cu en suero sanguíneo, los exámenes ginecológicos, la evaluación de los indicadores reproductivos, así como los criterios de inclusión y exclusión están descritos en materiales y métodos generales.

Procesamiento estadístico de los resultados.

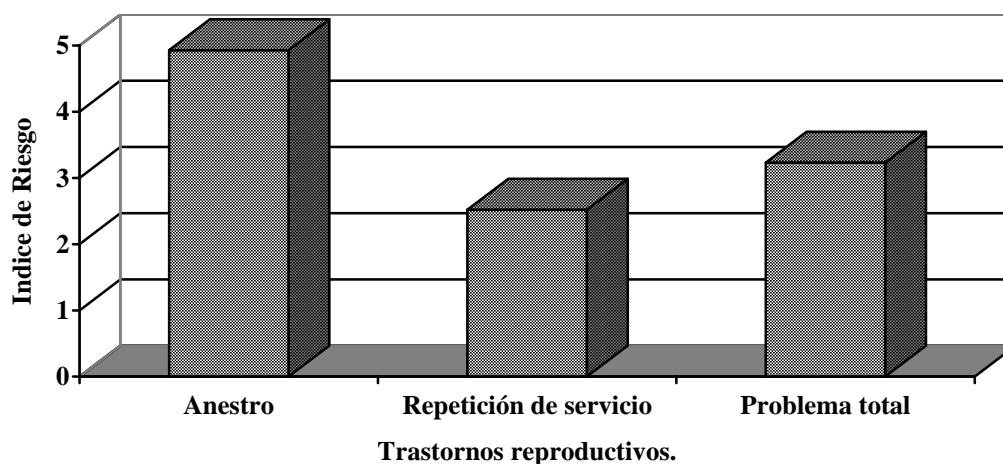
Se empleó el paquete estadístico STATGRAPHICS VER 5.0. Se realizó un análisis de correlación lineal simple entre los niveles de Cu en suero sanguíneo y los indicadores reproductivos. Se calcularon los estadísticos descriptivos para todas las variables; la comparación de los tratamientos en los indicadores reproductivos y la cupremia se realizó mediante un análisis de varianza de

clasificación simple (ANOVA) previa comprobación de la homogeneidad de varianzas de los tratamientos, aplicándose la prueba SNK para la comparación de las medias; en el caso de los niveles de Cu post tratamiento se tomó en cuenta el estado inicial de los mismos como covariable.

2.4.3: Resultados y Discusión.

El estudio del riesgo relativo demostró que la hipocupremia constituyó un factor de riesgo significativo ($p < 0.0001$) para los trastornos reproductivos, verificándose índices de riesgos para el anestro de 4.93 (IC 95 % 2.76 - 8.69), para la repetición de servicio de 2.52 (IC 95% 1.78 - 3.54) y para la sumatoria de ambos 3.23 (IC 95% 2.39 - 4.36), que indican que los animales hipocuprémicos tienen más posibilidades de padecerlos que los normocuprémicos; estos resultados permiten afirmar que existe una relación directa entre la hipocupremia y la presentación de estos trastornos reproductivos (figura 2.4.1). Considerando la información disponible, pudiera ser éste el primer reporte sobre la magnitud real de estos riesgos, proporcionando con ello un aporte al estudio de esta enfermedad carencial y sus implicaciones sobre la actividad reproductiva.

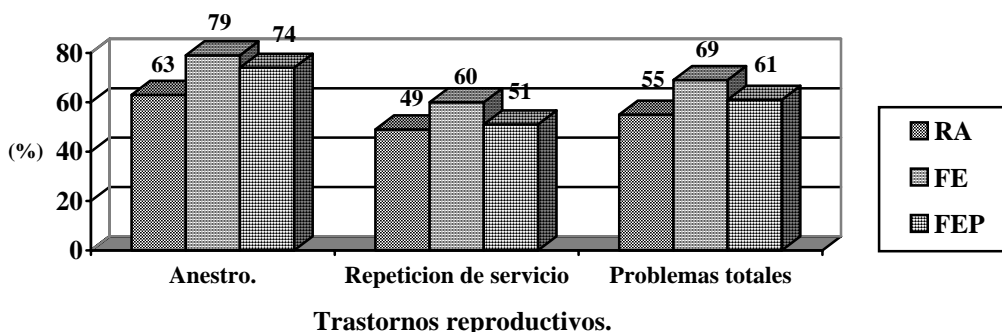
Figura 2.4.1 Riesgo relativo de los trastornos reproductivos estudiados en hembras bovinas hipocuprémicas.



Los resultados del cálculo del riesgo atribuible (RA), fracción etiológica (FE) y fracción etiológica de la población (FEP) se exponen en la figura 2.4.2; los valores del RA indican que el 63% de los casos de anestro, el 49% de los de repetición de servicio y el 55% de la sumatoria de ambos dentro de población total están determinados por la hipocupremia. La FE observada revela que el 79, 60

y 69% de cada uno de ellos respectivamente, dentro de los hipocuprémicos están asociados a este factor de exposición. La FEP encontrada representa que se puede obtener una reducción del 74, 51 y 61% de los casos de cada trastorno reproductivo en la población si se aplica el tratamiento correctivo de la hipocupremia.

Figura 2.4.2: Valores del RA, FE y FEP para los trastornos reproductivos en hembras bovinas hipocuprémicas.

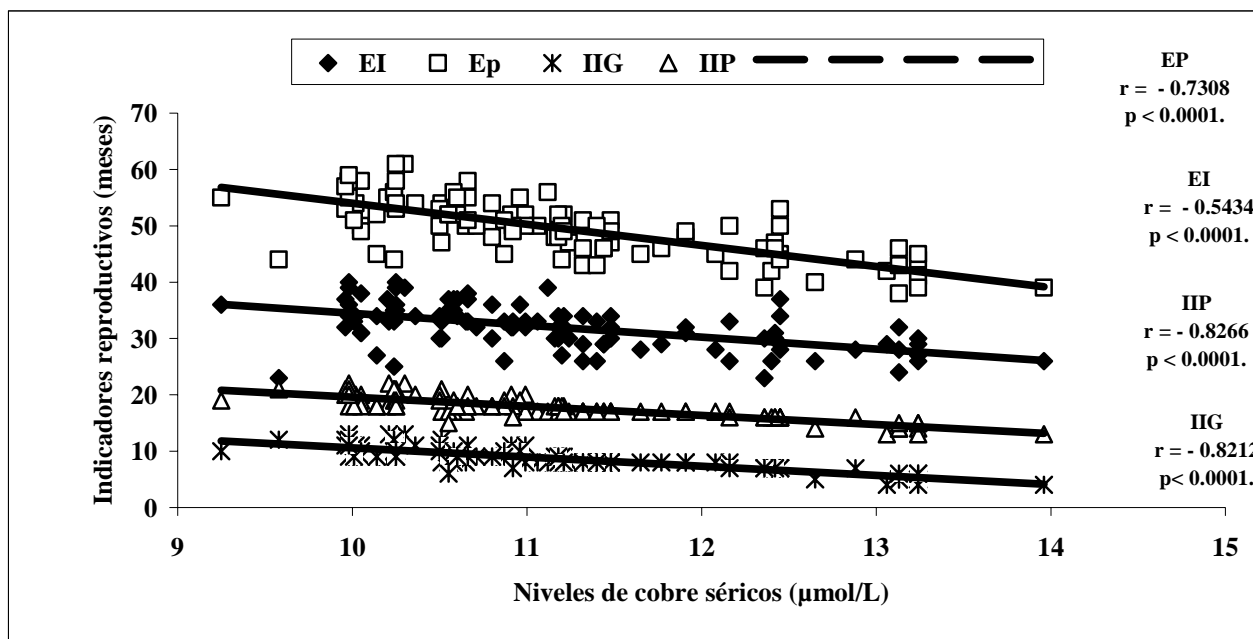


Estos resultados son de gran interés práctico, pues la interpretación adecuada de los mismos servirá de base para instaurar el tratamiento correctivo de la hipocupremia, con el que se alcanzaría un efecto inmediato productivo y económico, motivado por el aumento del comportamiento reproductivo de los rebaños, disminuyendo los costos por tratamientos hormonales de estos trastornos; como ha sido recomendado por otros autores (Ballantine *et al.*, 2002; Daugherty *et al.*, 2002)

Al realizar el estudio de la correlación entre el nivel de Cu sanguíneo con los indicadores reproductivos en la novillas, se aprecia la influencia negativa de la deficiencia de Cu sobre el desempeño reproductivo de esta categoría; provocando un incremento de la edad a la incorporación, intervalo incorporación gestación, incorporación parto y la edad al parto.

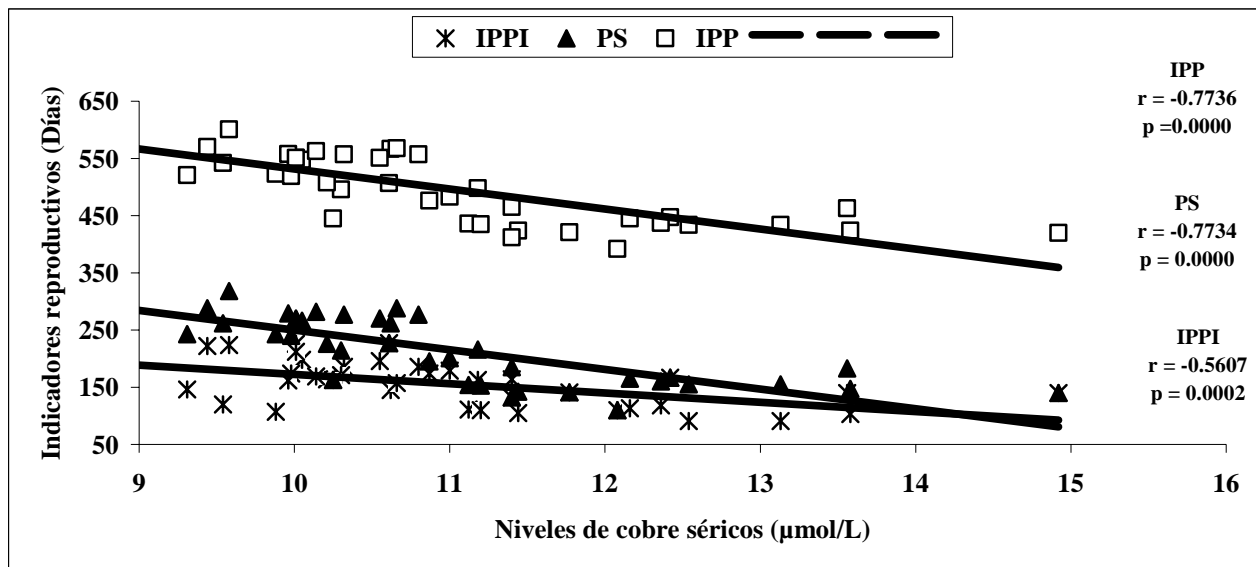
En la novillas se demostró una correlación negativa y altamente significativa ($p < 0.0001$) entre la cupremia y la edad a la incorporación ($r = - 0.5434$), intervalo incorporación gestación ($r = - 0.8212$), incorporación parto ($r = - 0.8266$) y la edad al primer parto ($r = - 0.7308$), lo que evidencia que a medida que se incrementó el nivel de Cu sanguíneo se encontraron indicadores reproductivos más satisfactorios (figura2.4.3).

Figura 2.4.3: Correlación espontánea entre los niveles de Cu en sangre y los indicadores de eficiencia reproductiva evaluados en las novillas.



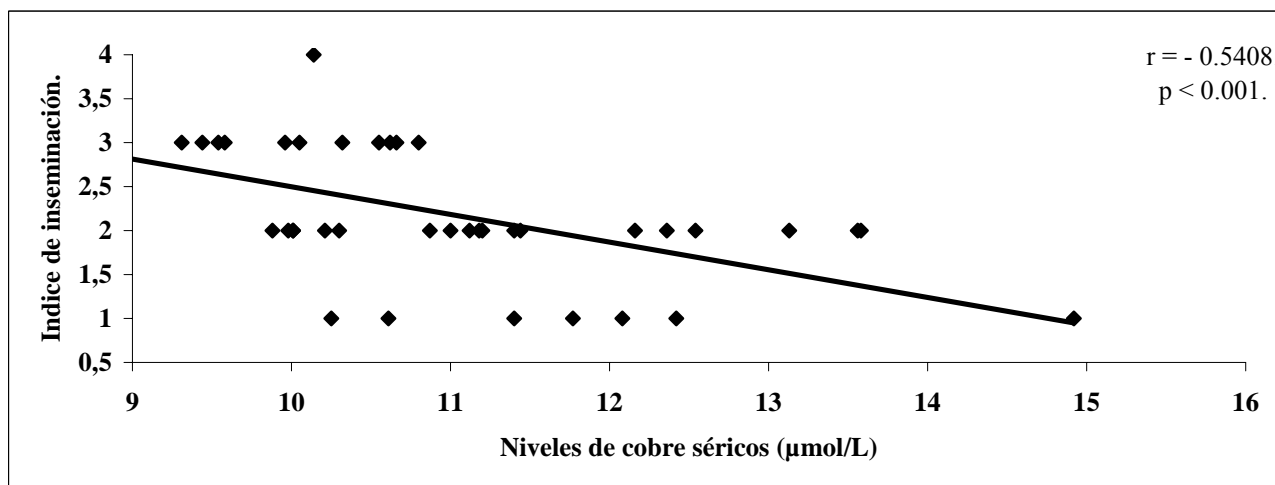
La correlación espontánea entre los niveles de Cu séricos y los indicadores reproductivos evaluados en las vacas demuestra que existió una correlación negativa y altamente significativa ($p < 0.0001$) entre la cupremia y el intervalo parto-primera inseminación ($r = -0.5607$), periodo de servicio ($r = -0.7734$), y el intervalo parto-parto ($r = -0.7736$), esto indica que en la medida que el Cu sanguíneo se incrementó estos indicadores mostraron mejor comportamiento (Figura 2.4.4).

Figura 2.4.4: Correlación espontánea entre los niveles de Cu en sangre y los indicadores reproductivos evaluados en las vacas.



La figura 2.2.5 muestra que en las vacas existió una correlación negativa y altamente significativas ($p < 0.001$) entre la cupremia y el índice de inseminación ($r = -0.5408$).

Figura 2.4.5: Correlación espontánea entre los niveles de Cu en sangre y el índice de inseminación (II) en las vacas.



El estudio de la relación experimental o inducida mostró que la administración de diferentes dosis de Cu en animales hipocuprémicos tuvo un efecto beneficioso sobre los niveles de Cu en suero sanguíneo y los indicadores reproductivos de los animales tratados (tabla 2.4.1).

Tabla 2.4.1: Efecto de la administración de diferentes concentraciones de Cu sobre la cupremia y algunos indicadores reproductivos.

Parámetros	Tratamientos (mg)				EE (\bar{x})
	0.	25.	50.	100.	
Cobre sérico ($\mu\text{mol/L}$)	10.84 ^c	10.66 ^c	12.96 ^b	13.79 ^a	± 0.16 ^{***}
Intervalo parto - 1ra inseminación (Días)	188.4 ^b	171.2 ^b	135.3 ^a	124.8 ^a	± 8.35 ^{**}
Periodo de servicio (Días)	227.2 ^b	223.4 ^b	152.9 ^a	135.5 ^a	± 8.93 ^{***}
Intervalo parto-Parto (Días)	508.9 ^b	503.4 ^b	435.8 ^a	416.4 ^a	± 8.97 ^{***}
Presentaciones de celos (%)	30 ^c	60 ^b	90 ^a	90 ^a	-- [*]
Gestaciones (%)	20 ^b	20 ^b	89 ^a	89 ^a	-- ^{***}

Valores promedios con letras no comunes en la misma fila indican diferencias significativas.

* Nivel de significación ($p < 0.05$).

** Nivel de significación ($p < 0.01$).

*** Nivel de significación ($P < 0.001$).

Se comprobó que en el grupo control al final del experimento los animales mantuvieron su estado carencial, con bajos valores de cupremia y un pobre desempeño reproductivo, caracterizado por largos intervalos parto-primera inseminación, parto-concepción, parto-parto y bajos porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones, éstos indicadores están en correspondencia con los reportados en otros estudios desarrollados en nuestro país en similares condiciones de producción (Reinoso, 2000; Reinoso y Pino, 2003; Lima *et al.*, 2003; 2007).

Los animales tratados con 25 mg de Cu, solo presentaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con el grupo control en el porcentaje de presentaciones de celo, no influyendo sobre los demás indicadores reproductivos; demostrando que el tratamiento de los animales con esta dosis del mineral resulta insuficiente para restaurar los niveles de Cu en suero sanguíneo y mejorar los indicadores reproductivos.

Los mejores resultados se obtuvieron en los grupos tratados con 50 y 100 mg de Cu, con los que se alcanzaron los valores normales de cupremia para la especie bovina (Álvarez, 2001; McDowell, 2005) y una mejoría ostensible de los indicadores reproductivos evaluados; sin diferencias estadísticas significativas entre ellos; sin embargo, con respecto a los grupos controles y tratado

con 25 mg de Cu difieren significativamente ($p < 0.05$) para los porcentajes de celo, ($p < 0.01$) para el intervalo parto primera inseminación y ($P < 0.001$) para los niveles de Cu en suero sanguíneo, el periodo de servicio y el intervalo parto-parto, corroborando los resultados alcanzados en trabajos anteriores (Walter y Marro, 2003; García y Cuesta, 2004)

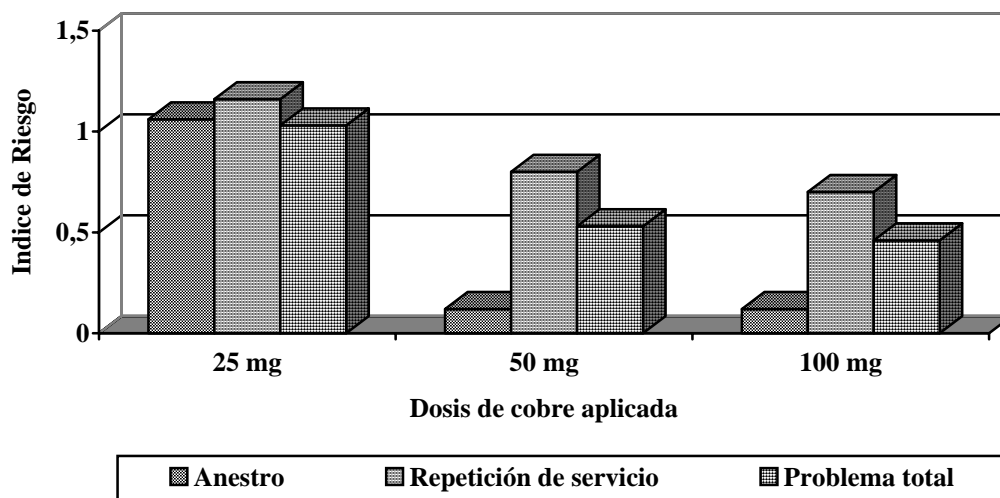
Se encontró una correlación positiva y altamente significativa entre la dosis de Cu inyectada y los niveles de Cu séricos y negativa y altamente significativa entre esta y el IPPI, PS e IPP (tabla 2.4.2) y ello permite explicar el hecho de que los mejores resultados en la suplementación sobre los indicadores reproductivos se alcanzaran con 50 y 100 mg de Cu.

Tabla 2.4.2: Análisis de correlación para medir la influencia que ejerce la dosis de Cu inyectada sobre las concentraciones de Cu séricas y los indicadores reproductivos evaluados.

Relación	Coefficiente de correlación (r)	Significación estadística
Dosis- Cobre	- 0.8089	$p < 0.0001$
Dosis- IPPI	- 0.5430	$P < 0.001$
Dosis-PS	- 0.6635	$p < 0.0001$
Dosis-IPP	- 0.6659	$p < 0.0001$

El estudio del riesgo relativo para la presentación del anestro y la repetición de servicio en animales expuestos al tratamiento con diferentes concentraciones de Cu, demostró que 25 mg del microelemento no poseen efecto sobre dichos trastornos, obteniéndose índices de riesgos para el anestro de 1.06 (IC 95% 0.79 – 1.41), para la repetición de servicio de 1.16 (IC 95 % 0.73- 1.84) y para la sumatoria de ambos de 1.03 (IC 95 % 0.72 – 1.47). Sin embargo, 50 y 100 mg de Cu si mostraron un efecto protector significativo para el anestro ($p < 0.0001$), con índices de riesgos de 0.12 (IC 95 % 0.03 – 0.47) en ambos casos; para la repetición de servicio fueron de 0.80 (IC 95 % 0.40 – 1.60) y 0.70 (IC 95 % 0.33 – 1.46). Estas dosis disminuyeron ($P < 0.05$) el riesgo para los problemas reproductivos totales con valores de 0.53 (IC 95 % 0.29 – 0.96) y 0.46 (IC 95 % 0.24 – 0.89). Los resultados demuestran una disminución del riesgo en todos los trastornos evaluados en la medida que se aumentaron las concentraciones de Cu (figura 2.4.6).

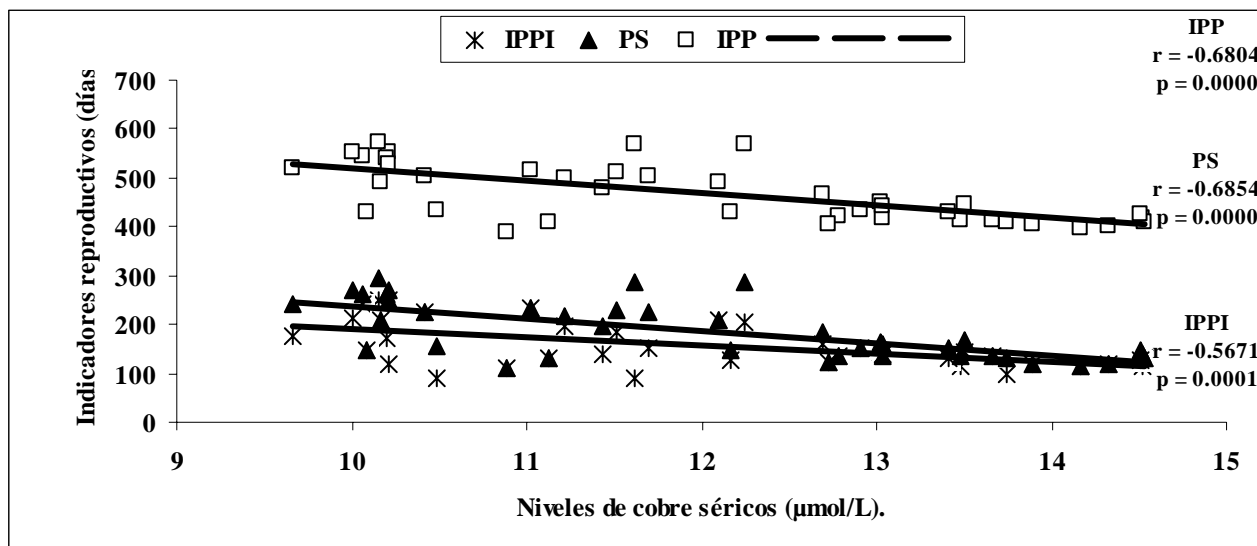
Figura 2.4.6: Variaciones del riesgo relativo para los trastornos reproductivos estudiados (anestro y repetición de servicio), según las dosis de Cu aplicadas en la suplementación.



Se corrobora y prueba de manera experimental la asociación entre la cupremia y el comportamiento reproductivo y la eficacia del tratamiento con 50 y 100 mg de Cu por vía parenteral para incrementar las concentraciones de Cu en sangre y mejorar los indicadores reproductivos, y que los animales tratados con Cu tienen menos posibilidades de padecer trastornos reproductivos que los que no son suplementados con este mineral.

En los animales con cupremia inducida (figura 2.4.7), mediante la administración de diferentes dosis de Cu se demostró una correlación negativa y altamente significativa ($p < 0.0001$), entre los niveles de cobre en suero sanguíneo y IPPI ($r = -0.5671$), PS ($r = -0.6854$) y el IPP ($r = -0.6804$), lo que indica que en la medida que el Cu sanguíneo se incrementó, estos indicadores fueron más eficientes.

Figura 2.4.7: Correlación entre los niveles de Cu en sangre posteriores al tratamiento con Cu y los indicadores de eficiencia reproductiva evaluados en las vacas.



Los resultados encontrados en las correlaciones tanto espontánea como inducida entre la cupremia y los indicadores reproductivos de las novillas y las vacas, que son los primeros estudios de este tipo sobre el tema, según la bibliografía disponible y consultada, demuestran que la correlación se establece en un rango de 9.8 ± 1.0 a 14.0 ± 0.9 $\mu\text{mol/L}$ y permiten explicar los índices de riesgos obtenidos para los trastornos reproductivos estudiados (anestro y repetición de servicio) en animales hipocuprémicos y en los tratados con diferentes dosis de Cu, así como el efecto de éstas sobre el comportamiento reproductivo, expuesto en la tabla 2.4.1.

Además, los valores de las correlaciones evidencian que a medida que se incrementó el nivel de Cu sanguíneo, disminuyeron los indicadores reproductivos, lo que trae como consecuencia que en nuestros rebaños, donde existe una alta incidencia de la deficiencia de Cu (García y Cuesta, 2004; Pedroso, 2005) se eleve la edad al primer parto en las novillas disminuyendo el potencial lechero de las mismas y del número de crías y lactancias durante la vida útil de nuestras vacas.

Estos resultados explican el bajo desempeño reproductivo observado en rebaños con deficiencia de Cu, caracterizado por infertilidad, anestros, repetición de servicios, estros irregulares, estros silenciosos, abortos, retenciones de placentas e incremento en los días abiertos y el periodo

interpartal (Correa, 2000; Royal *et al.*, 2000; Kendall *et al.*, 2001; Kellogg *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2004 a b). Estas consideraciones reafirman la importancia del Cu para el comportamiento reproductivo de las hembras bovinas y permiten explicar los resultados alcanzados por otros autores que han señalado a la suplementación cúprica como uno de los métodos más eficaces para incrementar el comportamiento reproductivo de las mismas (Ruiz *et al.*, 1995; Kellogg *et al.*, 2003; García *et al.*, 2005; García *et al.*, 2007; Álvarez, 2007), aunque no se han identificado con exactitud los mecanismos de acción (Ahola *et al.*, 2005).

Se ha planteado que el Cu está relacionado con la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias, modulando la capacidad de liberación de la hormona luteinizante (LH), por lo cual se cree que la subfertilidad y otras alteraciones reproductivas son debidas a bajos niveles o inhibición en la síntesis de hormonas gonadotróficas, que provoca la no ocurrencia de la ovulación, pobre desarrollo del cuerpo lúteo e insuficiente producción de P₄ (Corbellini, 1998).

En tal sentido se ha informado una amplitud más baja de LH (P <0.05) en ganado con deficiencia de Cu al compararlo con animales normocuprémicos (Phillippo *et al.*, 1987; Xin *et al.*, 1993). La administración de GnRH en ratas con tenores normales de Cu, aumentó la liberación de LH y FSH hipofisarias, en comparación con las hipocuprémicas, posiblemente el Cu estimula los receptores de GnRH en la hipófisis facilitando su acción (Kochman *et al.*, 1997).

Numerosas investigaciones sugieren que el aumento del estrés oxidativo en animales hipocuprémicos se asocia con la disminución de la enzima antioxidante Cu/Zn-SOD, de la cual el Cu es un cofactor catalítico indispensable (Ji-Pan y Loo, 2000). También la disminución de la actividad de la citocromo c-oxidasa, que se encuentra involucrada en la correcta reducción del O₂ en la cadena respiratoria, se acompaña de un incremento en la reducción univalente del O₂, con el consiguiente aumento de la concentración intracelular de O₂⁻, si bien la CCO no es una enzima antioxidante, la alteración de su función posee un claro efecto prooxidante (Guetens *et al.*, 2002).

Para que la actividad SOD disminuya significativamente es necesario una hipocupremia severa (menos de 5 µmol/L) durante un período de tiempo mayor a 1 mes (Picco *et al.*, 2002), mientras que la disminución de la actividad de la Cp es proporcional a la disminución de la cupremia (Picco *et al.*, 2004). Tomando en cuenta estos factores, resulta lógico pensar que la Cp juega un papel más importante en el estrés oxidativo.

La actividad de la Cp es considerada antioxidante porque permite la oxidación del hierro del estado ferroso (Fe^{2+}) al estado férrico (Fe^{3+}), lo que imposibilita la utilización del Fe^{2+} para formar radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) por medio de la reacción de Fenton. También la Cp tiene la capacidad de fijar Cu (6 átomos de Cu por cada molécula), impidiendo que los átomos libres del mismo actúen como catalizadores del daño oxidativo, inhibe la peroxidación de lípidos de membrana estimulada por iones de Cu y Fe y presenta un leve efecto de barrido sobre el H_2O_2 , O_2^- y $\cdot\text{OH}$ (Miyajima *et al.*, 2002; Garrik *et al.*, 2003)

Los radicales libres como el anión superóxido (O_2^-) se producen en el cuerpo lúteo durante la síntesis de P_4 , siendo transformado en las células luteales en H_2O_2 , que es luteolítico e inhibidor del transporte de colesterol a la mitocondria para convertirse en pregnenolona, con disminución de la formación de P_4 (Márquez *et al.*, 2001).

De tal manera, la deficiencia de Cu generaría incremento del estrés oxidativo, especialmente a nivel ovárico, afectando los tejidos esteroideogénicos del mismo con disminución de la síntesis de estrógenos y de progesterona, daños en el oocito, afectación del desarrollo embrionario y mortalidad embrionaria precoz con la consiguiente repercusión negativa sobre los indicadores reproductivos (Bach, 2002).

La citocromo-c-oxidasa representa la enzima terminal de la cadena respiratoria y cataliza la transferencia de 4 electrones al O_2 para formar dos moléculas de agua y ATP, participando en la obtención de energía (Gebhard *et al.*, 2001; Heron *et al.*, 2001), por lo que en animales con hipocupremia se afecta el metabolismo energético y la CC, al respecto se reportó una correlación positiva y significativa entre ésta y la cupremia (Cuesta *et al.*, 2003). Además los animales con hipocuprosis no mantienen una CC adecuada y en el puerperio sufren un alargamiento significativo del período parto primer celo y liberan menos LH posterior a la estimulación exógena con GnRH comparadas con aquellas vacas que son capaces de mantener su condición corporal (Pedroso, 2004).

La enzima Cu dependiente Lisil oxidasa (LOX) en las células de la granulosa del folículo primario y en la ausencia del estímulo de FSH es estimulada por el factor de crecimiento (GDF-9) y la activina dando lugar a la formación de los precursores de las células tecaes, surgiendo esta capa celular y la formación de la membrana basal. Posteriormente, en el folículo preantral las células multicapas de la granulosa tienen relativamente pocos receptores de FSH y se exponen a bajos

niveles de la misma, en este ambiente la LOX sigue siendo estimulada y coordina el crecimiento de la teca, la expansión de membrana basal y la formación de la cavidad antral. Finalmente en el folículo antral, hay mayor cantidad de receptores para la FSH, con niveles más altos de la misma, esto cambia los efectos de la activina y el factor de crecimiento (GDF-9) de estimulatorios a inhibitorios, reduciendo la actividad de la LOX, deteniéndose el crecimiento del folículo (Harlow *et al.*, 2003).

En la hipocuprosis disminuye la actividad de la LOX provocando perturbación del modelo normal de crecimiento de folículo preovulatorio, por lo que disminuye la secreción del estradiol ovárico, y el pico de estradiol del folículo preovulatorio, que es el signo endocrino responsable para la inducción del estro provocando perturbación del mismo y de la ovulación (Kemdall *et al.*, 2003)

Durante la deficiencia de Cu disminuye la actividad de la enzima 15'15' dioxigenasa, que es Cu dependiente y responsable de la ruptura del doble enlace central del carbono 15 de la molécula de caroteno para formar dos moléculas de vitamina A (Izaguirre y Shimada, 2001), por lo que la hipocuprosis puede ocasionar una hipovitaminosis A y ésta a su vez es responsable de provocar daños en la hipófisis y esclerosis del ovario, atresia y degeneración de los folículos ováricos, disminución del crecimiento del cuerpo lúteo, reducción de los niveles de P₄ durante el ciclo estral, retraso en la aparición del primer celo, inducción de celos silenciosos, aumento del número de quistes ováricos, reducción de los índices de concepción y mortalidad embrionaria precoz (Bach, 2002).

2.4.4: Conclusiones.

Se demostró la existencia de una correlación negativa entre la cupremia en un rango de 9.8 ± 1.0 a 14.0 ± 0.9 $\mu\text{mo/L}$ con los indicadores reproductivos, tanto en animales con cupremia espontánea como inducida, lo que se evidenció en un aumento del riesgo a presentar anestro, repetición de servicio y de los principales indicadores de eficiencia reproductiva evaluados en novillas y vacas en la medida que descende la concentración de Cu sérico.

2.5: Experimento 4: Confirmación del efecto de la suplementación del Cu por vía parenteral sobre el comportamiento reproductivo en hembras bovinas cíclicas y anéstricas con diferentes valores de cupremia.

2.5.1: Introducción.

La suplementación de Cu por vía oral ha repercutido favorablemente sobre los aspectos reproductivos, productivos y económicos del ganado bovino lechero (Stanton *et al.*, 2000); no obstante esta posee varios inconvenientes entre los que caben mencionar, en primer lugar la gran cantidad de antagonistas que interfieren su absorción y metabolismo (Underwood y Suttle, 2001); por consiguiente, el uso de minerales inyectables es una alternativa de creciente interés mundial.

En tal sentido existen opiniones contradictorias, algunos investigadores no han reportado diferencias significativas en la presentación del primer celo y la concepción al primer servicio con respecto al grupo control en animales tratados con Cu por vía parenteral (Arechiga *et al.*, 1998); otros han demostrado que la aplicación de ésta terapéutica ha aumentado la tasa de gestación, reducido el período de servicio y la incidencia de quistes ováricos y retención de placentas (Daugherty *et al.* 2002).

En el experimento tres de este trabajo se demostró una alta correlación entre los niveles de cupremia y los indicadores reproductivos de la hembra bovina y la eficacia de 50 mg de Cu para el mejoramiento de los mismos; sin embargo no existen en la literatura discusiones científicas concluyentes sobre ésta temática, además se desconocen los efectos que pudiera tener la suplementación del Cu por vía parenteral sobre los parámetros de eficiencia reproductiva en animales hipo y normocuprémicos.

Por lo que el objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la suplementación de 50 mg de Cu por vía parenteral sobre el comportamiento reproductivo de las hembras bovinas cíclicas y anéstricas, tanto hipo como normocupremicas.

2.5.2: Materiales y Métodos.

Diseño experimental.

Se desarrolló en dos fases o etapas; en la primera se diagnosticaron y seleccionaron 115 animales hipocuprémicos; de ellas, 63 novillas [32 cíclicas (16 controles y 16 tratadas) y 31 anéstricas (16 controles y 15 tratadas)] y 52 vacas [30 cíclicas (12 controles y 18 tratadas) y 22 anéstricas (11 controles y 11 tratadas)]. En la segunda se seleccionaron 98 novillas normocuprémicas y cíclicas

(49 controles y 49 tratadas). Las consideraciones de animales cíclicos, anéstricos y repetidores de servicio están expuestas en materiales y métodos generales.

Ambas etapas fueron desarrolladas en el periodo lluvioso (Junio-Noviembre), trabajándose en todos los casos con hembras bovinas con una CC entre 3 y 4 puntos, procedentes de 3 centros de novillas y 3 vaquerías de la zona de estudio. En el caso de las novillas con un rango de edad entre 21 y 24 meses y un peso comprendido entre 300 y 310 kg. En las vacas se utilizaron animales con una edad comprendida entre los 6 y 8 años y un periodo de espera voluntario (PEV) de 60 días.

En las dos fases experimentales a los animales tratados se les inyectó subcutáneamente 50 mg de Cu cada dos meses hasta completar tres aplicaciones y los controles no recibieron suplementación cúprica, en todas las hembras hipocuprémicas anéstricas se emplearon tratamientos hormonales de inducción del celo; determinándose el efecto de la cuproterapéutica empleada sobre las concentraciones séricas de Cu y los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones.

Se realizó un estudio de riesgo relativo de padecer los trastornos reproductivos siguientes: anestro, repetición de servicio y problemas reproductivos totales (la sumatoria de ambos) en los animales tratados con el compuesto de Cu, considerando solamente las vacas y novillas cíclicas en ambas etapas, hipo y normocuprémicas, el mismo involucró a 132 hembras bovinas y se ejecutó según los procedimientos descritos en materiales y métodos generales.

Las metodoloías para la toma de muestras de sangre, las determinaciones de Cu en suero sanguíneo, los exámenes ginecológicos, la evaluación de los indicadores reproductivos, la dtección del celo y la inseminación artificial se realizaron según las metodologías descritas en materiales y métodos generales.

Tratamientos hormonales empleados.

Para la inducción del celo se empleó un esquema de tres inyecciones intramuscular (IM) de progesterona (P_4) a intervalo de 48 horas entre cada inyección en dosis de 90, 60, 60mg, seguida 48 horas posteriores de una inyección IM de 1 mg de benzoato de estradiol (Pedroso y Roller, 2004).

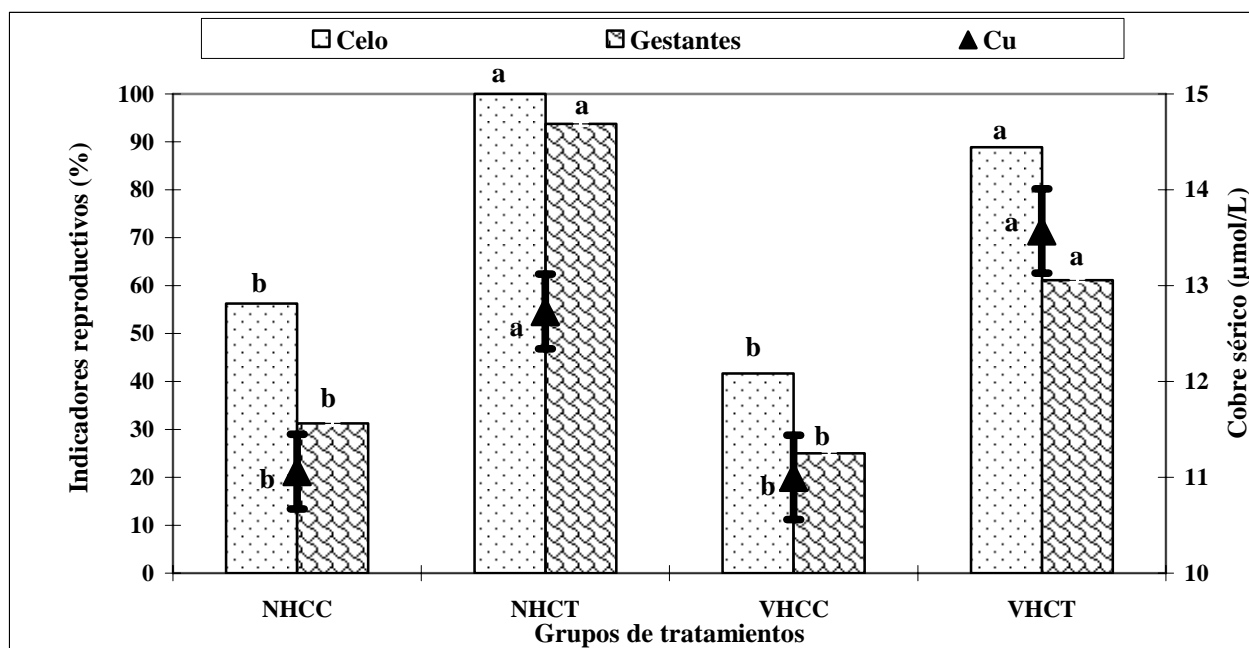
Procesamiento estadístico de los resultados.

Se empleó el paquete estadístico Statgraphics versión 5.0. Para la comparación de los tratamientos en los niveles de Cu séricos se aplicó una prueba de t. En el caso de las presentaciones de celo y de gestaciones se analizaron mediante una comparación de proporciones.

2.5.3: Resultados y Discusión.

La aplicación de 50 mg de Cu cada dos meses en animales hipocuprémicos cíclicos (figura 2.5.1), incrementó ($p < 0.001$) los niveles de Cu séricos en los grupos tratados con respecto a los grupos controles, tanto en vacas como en novillas. En ambas categorías, en los animales suplementados se incrementaron significativamente ($p < 0.01$) los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones con respecto a los animales utilizados como controles; demostrándose la asociación que existe entre la cupremia y el comportamiento reproductivo de las hembras bovinas.

Figura 2.5.1: Efecto de la administración parenteral de tres dosis de 50 mg de Cu en hembras bovinas hipocuprémicas cíclicas sobre la cupremia y el comportamiento reproductivo.



Leyenda:

NHCC: Novillas hipocuprémicas cíclicas controles (n = 16).

NHCT: Novillas hipocuprémicas cíclicas tratadas (n = 16).

VHCC: vacas hipocuprémicas cíclicas controles (n = 12).

VHCT: Vacas hipocuprémicas cíclicas tratadas (n = 18).

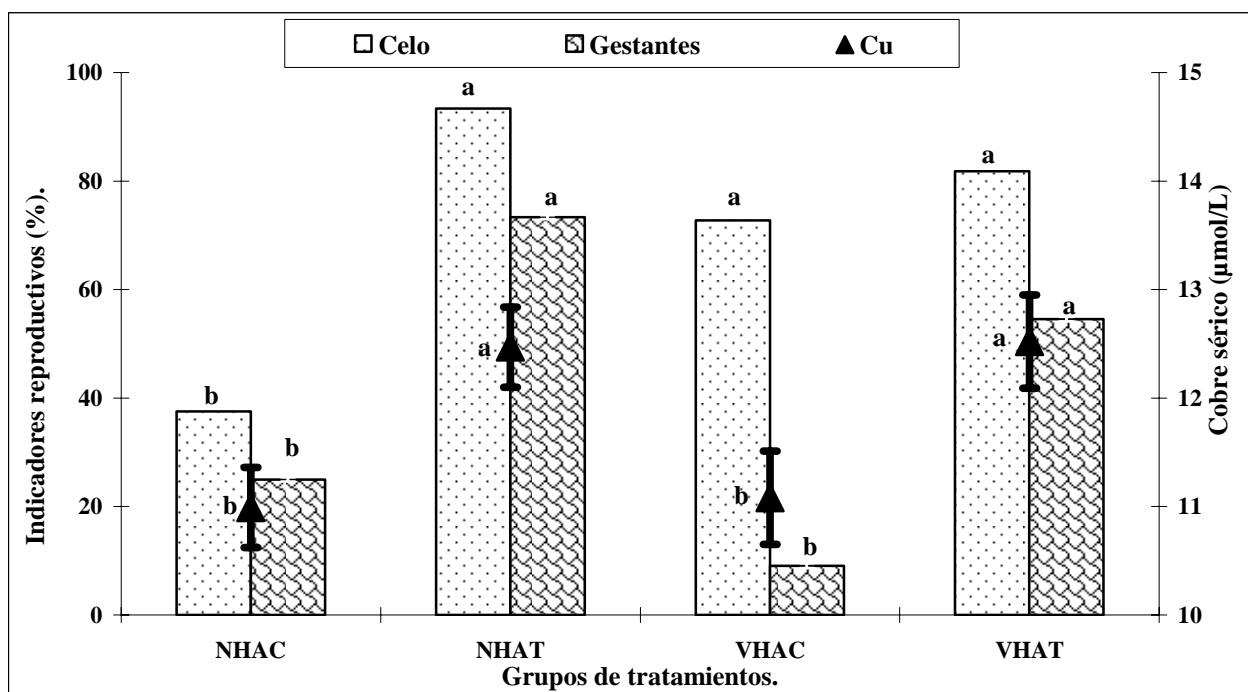
Entre los grupos de vacas y novillas tratadas no se apreciaron diferencias significativas entre los niveles de Cu en suero sanguíneo y los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones, éstas variables tampoco difieren significativamente entre ambas categorías de animales utilizados como controles, que muestran un franco deterioro de su potencial reproductivo.

La suplementación con Cu orgánico por vía oral en animales deficientes, aumentó el porcentaje de vacas con estructuras ováricas más desarrolladas y numéricamente mayores a los 45 días post parto, reduciendo los días de anestro post parto con respecto a las controles (Swenson *et al.*, 1998), con este tipo de suplementación se obtuvieron mayores porcentajes de gestaciones al primer servicio (Stanton *et al.*, 2001), reducción de los días abiertos y aumento en los porcentajes de vacas gestantes a los 150 de lactación en comparación con los compuestos inorgánicos (Uchida *et al.*, 2001). Sin embargo, el tratamiento con Cu parenteral, es en la actualidad un método práctico y efectivo; el mismo, en las hembras bovinas ha aumentado la cupremia, los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones (Brem *et al.*, 2002; Walter y Marro, 2003; Black y French, 2004; García *et al.*, 2007).

La suplementación cúprica en las novillas hipocuprémicas anéstricas (figura 2.5.2) aumentó ($p < 0.001$) los niveles de Cu séricos, y la combinación de esta con los tratamientos de inducción del celo aumentaron ($p < 0.01$) los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones en los animales tratados con respecto a las controles. En las vacas hipocuprémicas anéstricas el tratamiento con Cu parenteral incrementó la cupremia ($p < 0.01$) y la combinación del mismo con la terapéutica hormonal del anestro aunque no aumentaron de manera significativa las tasas de presentaciones de celo, si incrementaron ($p < 0.05$) las proporciones de concepción, en comparación con los animales utilizados como controles. Estos resultados corroboran la importancia del Cu para el normal desempeño reproductivo de los animales e indican que la suplementación del mismo potencia la respuesta a los tratamientos de inducción del celo en las hembras bovinas utilizando $P_4 + BE$, constituyendo los primeros reportes sobre el efecto de la asociación de ambos tratamientos, lo que constituye un aporte de este trabajo al estudio de la temática.

No se apreciaron diferencias significativas en los niveles de Cu en suero sanguíneo y los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones entre vacas y novillas tratadas con 50 mg de Cu, estas variables tampoco difieren entre ambas categorías de animales utilizadas como controles, que muestran una baja respuesta a los tratamientos hormonales de inducción del celo empleados; especialmente en la tasa de gestación, que se vio severamente afectada, principalmente en las vacas. Estos resultados coinciden con los reportados en otros estudios donde se han evaluado las combinaciones de progesterona y estradiol (Faure *et al.*, 1996; Pedroso *et al.*, 2000; Davis, 2004).

Figura 2.5.2: Efecto de la administración parenteral de tres dosis de 50 mg de Cu en hembras bovinas hipocuprémicas anéstricas sobre la cupremia y el comportamiento reproductivo.



Leyenda:

NHAC: Novillas hipocuprémicas anéstricas controles (n = 16).

NHAT: Novillas hipocuprémicas anéstricas tratadas (n= 15).

VHAC: vacas hipocuprémicas anéstricas controles (n = 11).

VHAT: Vacas hipocuprémicas anéstricas tratadas (n = 11).

La eficiencia obtenida hasta el presente en los programas de inducción y sincronización del estro son bajos, comprobándose que el 68 % de las hembras inseminadas no gestantes continúan en anestro posterior al servicio (García *et al.*, 2001; Pedroso, 2004); este inconveniente, alarga el intervalo ínter servicio y es fuente de cuantiosas pérdidas económicas (Macmillan *et al.*, 2001; Lucy, 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo con la terapéutica inductiva combinada con la suplementación cúprica son superiores a los mismos.

La suplementación cúprica en animales normocuprémicos, al igual que en los hipocuprémicos, resultó eficiente, al incrementar ($p < 0.0001$) los valores del Cu en suero sanguíneo, ($p < 0.01$) las presentaciones de celo y ($p < 0.001$) las proporciones de concepción en los animales tratados con respecto a los utilizados como control (tabla 2.5.1).

Tabla 2.5.1: Comportamiento de la cupremia y las presentaciones de celo y de gestaciones en novillas normocuprémicas cíclicas tratados con tres dosis de 50 mg de Cu por vía parenteral.

Indicadores	Tratadas	Control	E.S. dif ±
Animales estudiados (n).	49	49	-
Cobre (µmol/L).	14.58 ^a	12.79 ^b	0.23 ^{****}
Presentación de Celos (%).	94 ^a	78 ^b	- ^{**}
Gestantes (%).	86 ^a	57 ^b	- ^{***}

Valores promedios con letras no comunes en la misma fila indican diferencias significativas.

** Nivel de significación ($p < 0.01$).

*** Nivel de significación ($p < 0.001$).

**** Nivel de significación ($p < 0.0001$).

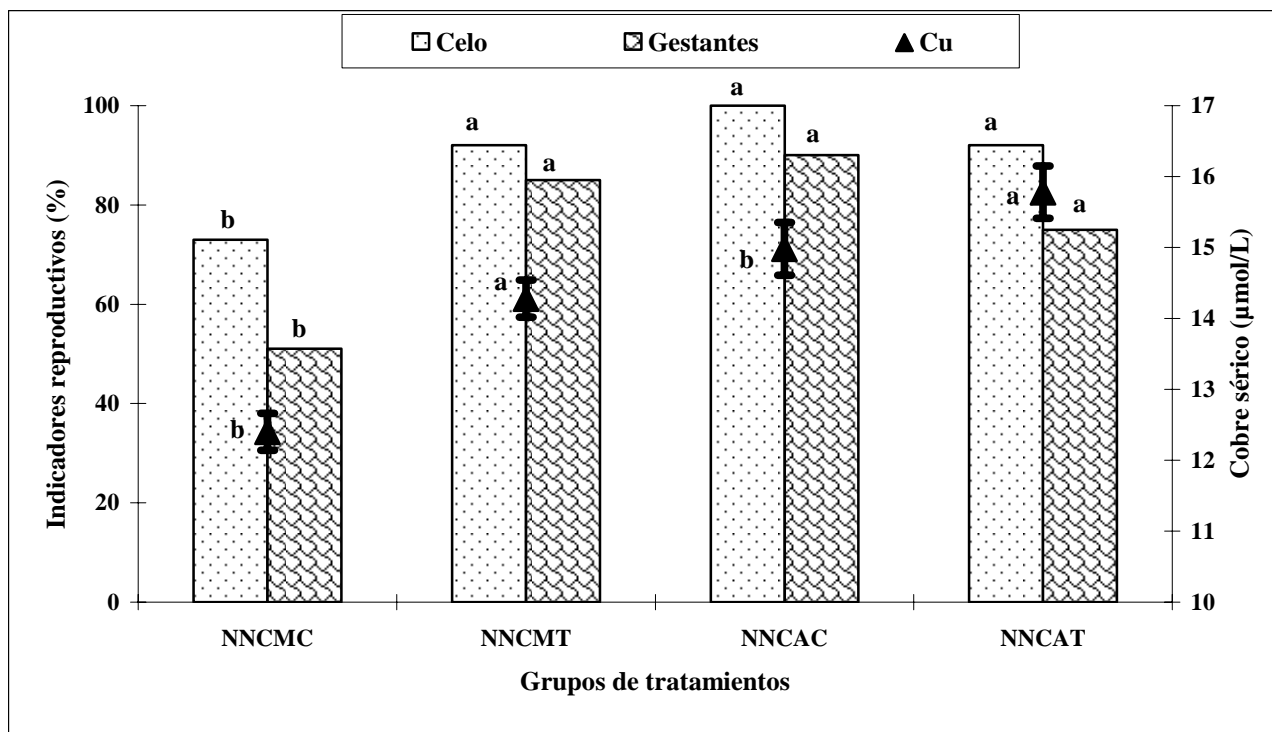
La estratificación de las novillas cíclicas normocuprémicas en dos niveles (hasta 14 µmol/L y superiores a éste nivel), atendiendo al límite superior de correlación entre la cupremia y los indicadores reproductivos encontrado en el experimento 3 de este trabajo, demostró que en los animales con concentraciones de Cu normales e inferiores a 14 µmol/L, la suplementación cúprica incrementó ($p < 0.0001$) el Cu sérico, ($p < 0.01$) las presentaciones de celo y ($p < 0.001$) los porcentajes de gestaciones en los animales tratados con respecto a los utilizadas como controles; sin embargo, en los animales con concentraciones de Cu superiores a 14 µmol/L, aunque el tratamiento incrementó ($p < 0.001$) la cupremia, las variables reproductivas no mostraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos tratados y controles (figura 2.5.3).

Estos resultados indican que 14 µmol/L constituyen el nivel óptimo de cupremia para una adecuada eficiencia reproductiva de la hembra bovina, al menos en las condiciones de Cuba, y que son los límites para obtener una respuesta beneficiosa con la suplementación cúprica; estos aspectos, por su novedad, son de gran importancia, pues constituyen un punto de partida en el estudio de la temática, especialmente para reconsiderar los valores de normalidad de este elemento para la especie bovina en las condiciones de nuestro país.

Varios estudios han demostrado que no existe correlación entre los niveles de Cu en suero sanguíneo y tejido hepático (órgano de reserva), por lo que en animales con valores de cupremia considerados normales se han diagnosticado altas proporciones de los mismos afectados de hipocuprosis global u orgánica general (Quiroz *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2006). La suplementación

permite restaurar las reservas en esta víscera y desde ahí movilizarla hacia los tejidos y órganos para normalizar los procesos fisiológicos relacionados con él. Una vez que estos niveles y la capacidad de utilización del mismo por las células para cumplir a cabalidad sus funciones son saturados, el Cu excedente se almacena en los órganos de reservas, especialmente el hígado; esta situación justifica el hecho de que a partir de 14µmol/L la suplementación no halla sido efectiva sobre el comportamiento reproductivo siendo éste limitado por otros factores dietéticos como la energía, las proteínas, vitaminas y otros minerales (Landau *et al.*, 2000).

Figura 2.5.3: Efecto de la administración parenteral de tres dosis de 50 mg de Cu en novillas normocuprémicas cíclicas, estratificadas en dos niveles de cupremia sobre la misma y el comportamiento reproductivo.

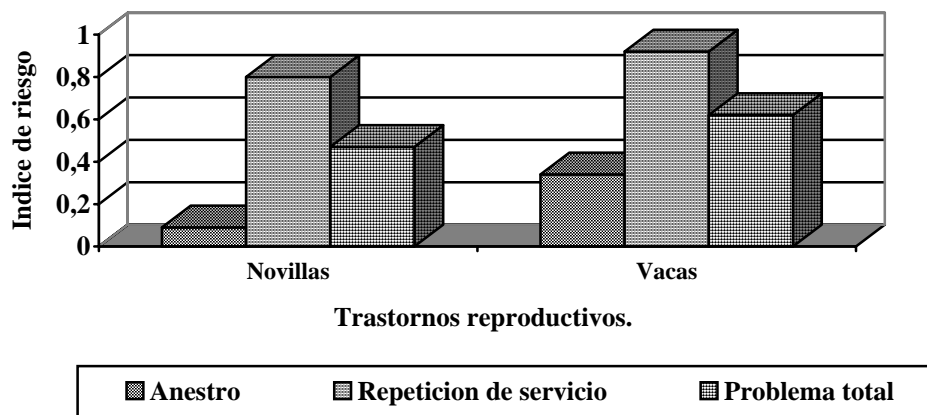


Leyenda:

- NNCMC:** Novillas normocuprémicas cíclicas nivel medio de Cu control (11.77-14µmol/L) (n = 37).
- NNCMT:** Novillas normocuprémicas cíclicas nivel medio de Cu tratadas (11.77-14µmol/L) (n = 39).
- NNCAC:** Novillas normocuprémicas cíclicas nivel alto de Cu control (>14µmol/L) (n = 12).
- NNCAT:** Novillas normocuprémicas cíclicas nivel alto de Cu tratadas (>14µmol/L) (n = 10).

El estudio del riesgo relativo en novillas y vacas expuestas al tratamiento con 50 mg de Cu por vía parenteral (figura 2.5.4) demostró que el mismo tiene un efecto protector para los trastornos reproductivos, disminuyendo el riesgo de padecerlos en ambas categorías de animales. Analizado éste de forma independiente, se apreció que en las novillas los valores del mismo fueron para el anestro 0.09 ($p < 0.0001$), con un IC 95% de 0.03 - 0.29, para la repetición de servicio 0.80 (IC 95% 0.50 - 1.28) y para la sumatoria de ambos 0.47 ($p < 0.001$), con un IC 95% 0.31 - 0.69. En las vacas los índices de riesgos fueron para el anestro 0.34 ($p < 0.01$), con un IC 95% 0.13 - 0.84, para la repetición de servicio 0.92 (IC 95% 0.48 - 1.77) y para la sumatoria de ambos 0.62 ($p < 0.05$), con un IC 95% 0.36 - 0.97, lo que indica que el riesgo fue menor en las novillas. Estos resultados demuestran por primera vez las magnitudes reales del índice de riesgo en animales suplementados para estos trastornos reproductivos, que reflejan el efecto protector de la suplementación parenteral del Cu contra los mismos, constituyendo un aporte de este trabajo dentro del estudio de la temática.

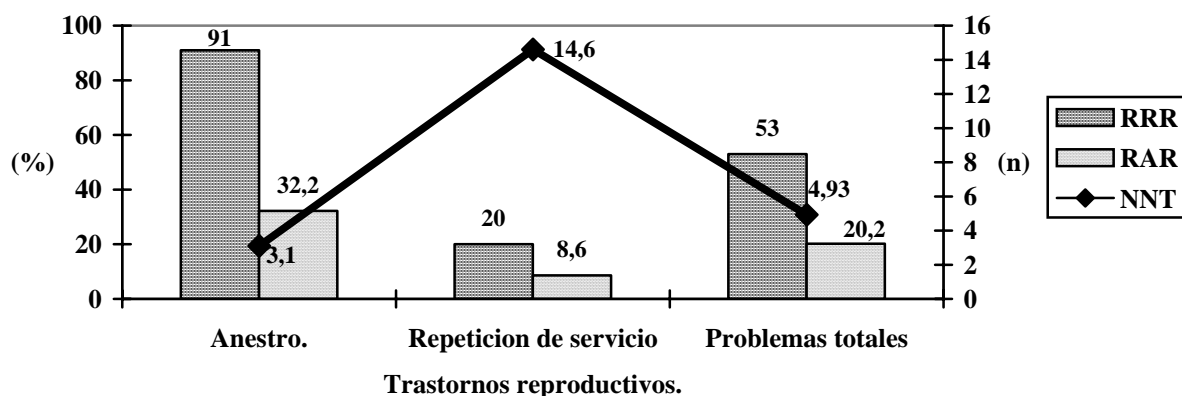
Figura 2.5.4: Riesgo relativo de los trastornos reproductivos en vacas y novillas suplementadas con 50 mg de Cu por vía parenteral.



Los resultados del cálculo de la reducción relativa del riesgo (RRR), reducción absoluta del riesgo (RAR) y número necesario de animales a tratar (NNT) en las novillas se exponen en la figura 2.5.5; los valores de la RRR indican una disminución en el 91% de los casos de anestro, el 20% de los de repetición de servicio y el 53% de la sumatoria de ambos en los animales tratados con 50 mg

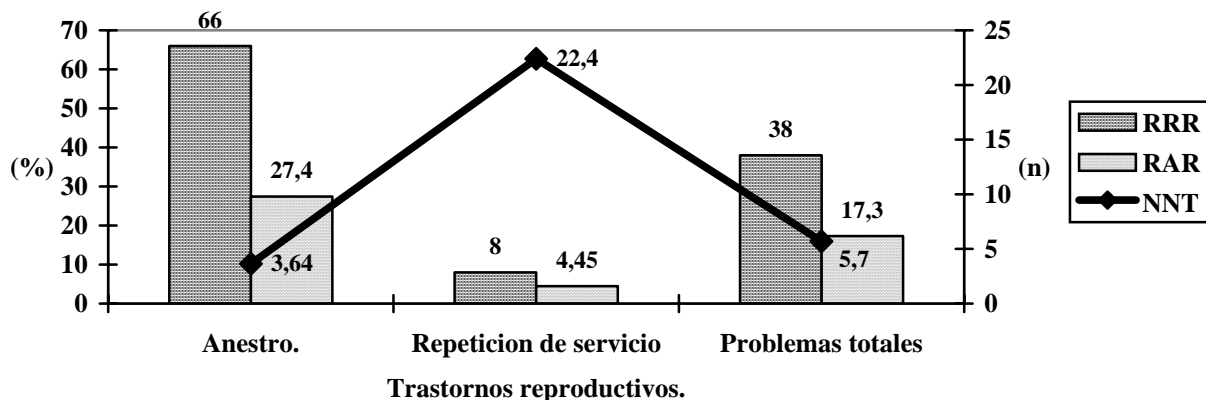
de Cu por vía parenteral en comparación con las testigos. La RAR observada fue del 32.2, 8.6 y 20.2%, lo que indica el número de casos en que es posible reducir cada uno de estos problemas en 100 animales tratados con Cu, por lo que el NNT para reducir un suceso de ellos es de 3.1, 14.6 y 4.93 respectivamente.

Figura 2.5.5: Cálculo de la RRR, RAR y NNT para reducir los trastornos reproductivos con la administración de 50 mg de Cu por vía parenteral en las novillas.



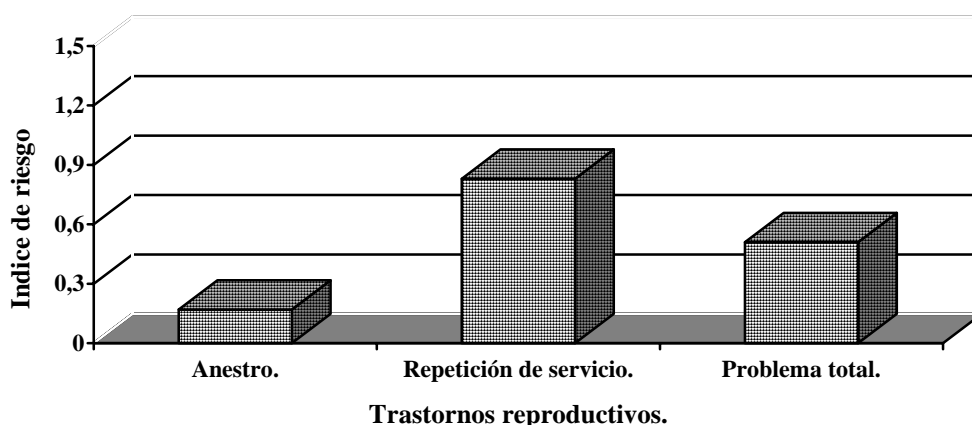
En las vacas (figura 2.5.6), la RRR fue de 66, 8 y 38%; la RAR fue de 27.4, 4.45 y 17.3%, y el NNT fue de 3.64, 22.4 y 5.7 para el anestro, la repetición de servicio y la sumatoria de ambos respectivamente.

Figura 2.5.6: Cálculo de la RRR, RAR y NNT para reducir los trastornos reproductivos con la administración de 50 mg de Cu por vía parenteral en las vacas.



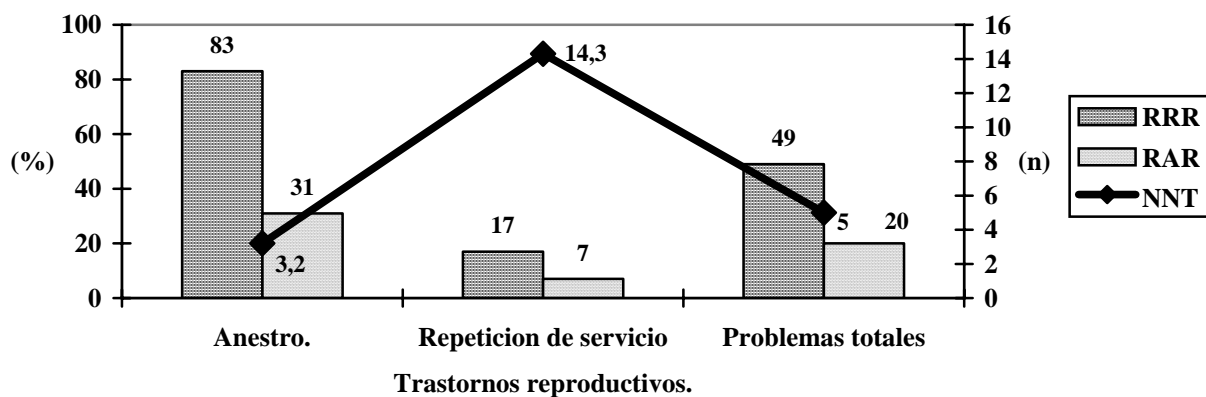
Analizado globalmente para ambas categorías en conjunto (figura 2.5.7), se confirma el efecto protector significativo de la suplementación empleada, siendo el riesgo relativo para el anestro de 0.17 ($p < 0.0001$), con un IC 95% 0.08 - 0.35, para la repetición de servicio de 0.83 (IC 95% 0.48 - 1.77) y para los trastornos reproductivos totales 0.51 ($p < 0.0001$), con un IC 95% 0.37 - 0.70. Los intervalos de confianza encontrados permiten afirmar que los animales tratados con Cu tienen menos posibilidades de padecer trastornos reproductivos que los que no son suplementados con este mineral y demuestran la eficacia del tratamiento con 50 mg de Cu por vía parenteral para incrementar los niveles de Cu en sangre y mejorar los indicadores reproductivos.

Figura 2.5.7: Riesgo Relativo de de los trastornos reproductivos en hembras suplementadas con 50 mg de Cu por vía parenteral, considerando todos los animales.



Los resultados del cálculo de la RRR, RAR y del NNT, considerando ambas categorías se exponen en la figura 2.5.8; los valores de la RRR indican una disminución en el 83% de los casos de anestro, el 17% de los de repetición de servicio y el 49% de la sumatoria de ambos en los animales tratados con 50 mg de Cu por vía parenteral en comparación con las testigos. La RAR observada fue del 31, 7 y 20%, lo que indica el número de casos en que es posible reducir cada uno de estos problemas en 100 animales tratados con Cu, por lo que el NNT para reducir un suceso de ellos es de 3.2, 14.3 y 5 respectivamente.

Figura 2.5.8: Cálculo de la RRR, RAR y NNT para reducir los trastornos reproductivos con la administración de 50 mg de Cu por vía parenteral considerando ambas categorías.



2.4.4: Conclusiones.

La administración de 50 mg de Cu por vía parenteral en las hembras bovinas con niveles de Cu en suero sanguíneo hasta 14 $\mu\text{mol/L}$ (hipo y normocuprémicas) incrementa la cupremia, los porcentajes de presentaciones de celo y de gestaciones, disminuye el riesgo relativo de presentar trastornos reproductivos y potencia los tratamientos de inducción del celo.

Capítulo 3: Criterios preliminares para la valoración económica.

3.1: Bases para su análisis.

El análisis se basa en la comparación del efecto económico del tratamiento de los animales con Cu parenteral con respecto a los grupos controles. Para el mismo fueron estimados los costos de las materias primas para garantizar el tratamiento anual de un animal, con un esquema terapéutico consistente en 50 mg de Cu cada dos meses por vía parenteral, el costo de oportunidad de la no aplicación de la terapéutica mencionada, según Rojas, (2006) y el beneficio económico por animal tratado sobre algunos indicadores convencionales del análisis de los estados financieros (Weston, 1994), a partir de la repercusión del tratamiento empleado sobre los porcentajes de gestaciones y los partos en cada grupo, considerando en ambos casos el valor de las producciones (leche y terneros), según otras evaluaciones similares realizadas con anterioridad (Pedroso, 2003). No se incluyeron en los análisis los resultados alcanzados en los animales anéstricos, que fueron sometidos a tratamiento hormonal del mismo.

Se estimó el impacto económico de la aplicación de 50 mg de Cu por vía parenteral a 1000 hembras bovinas, sobre la base de los resultados alcanzados en este trabajo, así como una comparación de la cantidad de producto necesario y los costos en materia prima de los tratamientos tanto oral como parenteral.

3.2: Costo de las materias primas del tratamiento anual por vía parenteral para cada animal.

Para el análisis del costo de las materias primas del tratamiento anual por animal utilizando la vía parenteral (tabla 3.2.1) se calculó el costo de una dosis de 2 ml (50 mg) y el de un tratamiento anual (seis dosis), tomando en consideración el precio de cada componente de la formulación de Cu utilizada, según el catalogo BDC international 2007 y la cantidad en que estos están contenidos en 1000 ml de la misma.

Tabla 3.2.1 Cálculo del costo de los componentes de la formulación empleada en CUC.

Producto	Cantidad para un Litro (g)	Costo en CUC de:				
		1 kg	1000 ml	1 ml	una dosis	Un tratamiento anual (6 dosis)
CuSO ₄ 5H ₂ O	25	66.20	1.65	0.0016	0.0032	0.0192
EDTA	9	216.28	1.94	0.0019	0.0038	0.0228
Glicerol	100	254.41	25.44	0.025	0.05	0.3
Total	-	-	29.03	0.029	0.058	0.348

3.3: Costo de oportunidad de la no aplicación del tratamiento con cobre por vía parenteral.

Para la evaluación del costo de oportunidad se tomó como base la reducción del periodo de servicio o de los días abiertos, a partir de los valores alcanzados en este indicador en el experimento 3 de este trabajo (tabla 2.4.1) tanto en el grupo control como en el tratado con 50 mg de Cu y considerando que cada día de vacía de una vaca significa un jornada de producción láctea que se pierde. Según el promedio de la misma en las unidades objeto de estudio constituye una pérdida potencial de 4 L vaca⁻¹ día⁻¹, que es comercializada en estos momentos a un valor promedio de \$ 2.51. Por concepto de terneros dejados de producir, un día sin gestar representa ¹/₁₃ terneros, que con los pesos al destete y precios de venta promedios alcanzados en las vaquerías de la zona de estudio, que son de 96 kg y \$ 192, constituyen una pérdida diaria de \$ 0.80.

Considerando lo anterior se aprecia que la no aplicación del tratamiento ocasiona un incremento de las pérdidas totales en las 20 vacas de 808.84 y por cada animal de \$ 40.44, lo que constituye el ingreso dejado de recibir (costo de oportunidad) y sirve de base para la toma de decisiones respecto a la aplicación del mismo (tabla 3.3.1).

Tabla 3.3.1: Evaluación del costo de oportunidad de la administración de 50 mg de Cu.

Parámetro	Grupos		Diferencia
	Tratado	Control	
Total de animales.	20	20	----
Promedio de días vacíos	93	167	+ 74
L/Vaca dejados de producir.	372	668	+ 296
Pérdidas por venta de la leche	933.72	1683.36	+ 749.64
Perdidas por las venta de terneros.	74.40	133.60	+ 59.20
Pérdidas totales.	1008.12	1816.96	+ 808.84
Pérdidas por vaca	50.40	90.84	+ 40.44

3.4: Impacto económico del tratamiento.

Se valoró el efecto económico del tratamiento, considerándose las hembras bovinas (novillas y vacas), tratadas y controles del experimento 4, excluyendo las que recibieron tratamiento de inducción del celo. En cada grupo se registraron las vacas que resultaron gestadas, a las que se le aplicó el 5 % de abortos (indicador obtenido de las unidades donde se desarrolló el trabajo) para estimar el número de partos en cada grupo. Se infirió la producción de cada vaca, estimándose una lactancia y producción láctea diaria según la media de las mismas en las unidades objeto de estudio

que son de 244 días y 4 L vaca⁻¹ día⁻¹ respectivamente; el resultado se multiplicó por el número de animales en cada tratamiento para estimar la producción total. El valor de la misma se calculó considerando el precio promedio de un litro de leche en estas vaquerías, que es comercializada en estos momentos a un valor de \$ 2.51.

Aplicando el índice de mortalidad de estas unidades (3 %) al total de nacimientos en cada grupo, se estimó el número de terneros, los que son destetados y vendidos como promedio a los ocho meses, con 96 kg de peso y un valor de \$ 192 pesos. La ganancia total se dividió entre el número de animales para calcular la ganancia por animal.

Las hembras bovinas que recibieron la suplementación cúprica presentaron mayores tasas de gestaciones, por lo que en este grupo se producirán mayores números de nacimientos, superiores volúmenes de producción láctea y se venderán mayor cantidad de terneros en comparación con los controles. Como consecuencia de la mayor eficiencia reproductiva y productiva se obtiene un beneficio económico por animal de **\$ 868.10** (tabla 3.4.1).

Tabla 3.4.1: Estimado de la repercusión productiva y económica de la suplementación con 50 mg de Cu por vía parenteral en las hembras bovinas.

Parámetro	Grupos		Diferencia
	Tratado	Control	
Total de animales.	83/100	77/100	---
Gestantes (n y %)	68/81.9	36/46.7	+ 35.2 %
Nacimientos (n y %).	64/80.7	34/44.2	+ 36.5 %
Producción láctea (L).	62 454/752	33 184/430	+ 322 L/vaca
Terneros vendidos (n y %).	62/75.0	33/42.8	+32.2%
Valor Leche \$.	156 759.54	83 291.84	+ 73 467.70
Valor Terneros \$.	11 904	6 336	+ 5 568
Ganancia total \$.	168 663.54	89 627.84	+79 035.70
Ganancia / vacas \$.	2 032.09	1 163.99	+ 868.10

Si partiendo de estos resultados estimamos el impacto de la aplicación de 50 mg de Cu a 1000 hembras bovinas incorporadas a la reproducción podemos inferir que por concepto del incremento del comportamiento reproductivo y productivo de las mismas se podrán incrementar las ganancias en **\$ 869 163** (tabla 3.4.2).

Tabla 3.4.2: Estimación del impacto productivo y económico de la suplementación con 50 mg de Cu por vía parenteral en 1000 hembras bovinas.

Parámetro	Grupos		Diferencia
	Tratado	Control	
Total de animales.	1000	1000	-
Gestantes (n)	819	467	+ 352
Nacimientos (n).	778	443	+ 335
Producción láctea (L).	752 457	430 961	+ 321 496
Terneros vendidos (n).	754	430	+ 324
Valor Leche \$.	1 888 667	1 081 712	+ 806 955
Valor Terneros \$.	144 768	82 560	+ 62 208
Ganancia total \$.	2 033 435	1 164 272	+ 869 163
Ganancia / vacas \$.	2 033.43	1164.27	+ 869.16

Si se toma en cuenta que con un kg de CuSO_4 pentahidratado se pueden formular 40 000 ml de solución inyectable al 2.5 %, cantidad con la que pueden ser tratadas con una dosis de 50 mg de Cu cada dos meses y durante un año 3333 hembras bovinas y que para mantener un tratamiento sistemático a este número de animales (1000) serían necesarios 12 000 ml del producto, queda claro que la deficiencia cúprica en los mismos puede ser resuelta con solo 0.3 kg de CuSO_4 .

Los estudios de la composición mineral del suelo y el pasto y de los balances de nutrientes realizados en el experimento uno de este trabajo, demuestran que los requerimientos de Cu en novillas y vacas; en ambos periodos, lluvioso y poco lluvioso, no son satisfechos. Si partiendo de esos resultados se elaborara una dieta típica que satisfaga el 100% de los requerimientos de este mineral, ésta debía contener 0.1 % de Cu, lo que se lograría con un nivel de inclusión de CuSO_4 en la mezcla mineral de 0.4 % y facilitar un consumo de la misma de 120 g/animal/día; en tales circunstancias los 0.3 kg de CuSO_4 son suficientes para preparar 75 kg de sal mineral, cantidad que suministra al libintum por vía oral solo alcanzarían para cubrir las exigencias de 21 animales durante 30 días. Además con tales niveles de inclusión y consumo, para suplementar la masa de animales considerada en este análisis (1000) durante un año se necesitarían 175.2 kg de CuSO_4 .

Se debe destacar que las materias primas para el tratamiento con Cu inyectable de manera sistemática cada dos meses de los animales mencionados costarían anualmente **340.00 CUC**, atendiendo al precio de los componentes de la formulación; mientras que por la vía oral y

utilizando una materia prima de menor costo (28.46 CUC), que la utilizada para formular el compuesto inyectable debido a la menor calidad y pureza del CuSO₄ empleado, el costo total de la suplementación de las 1000 hembras bovinas ascendería a **4 986.19 CUC** (tabla 3.4.3).

Tabla 3.4.3: Comparación del costo de las materias primas por tratamiento de la masa bovina considerada en el análisis según la vía de aplicación.

Tratamiento	Masa a tratar.	Costo del tratamiento de un animal/año. CUC	Costo total anual del tratamiento de 1000 animales. CUC
Inyectable	1000	0.34	340.00
Oral	1000	4.98	4 986.19

3.4 Conclusiones.

✓ La aplicación de 50 mg de Cu por vía perenteral en las hembras bovinas logró un beneficio económico por animal de \$ **868.10** en moneda nacional, reduciendo considerablemente las cantidades de producto y los costos de tratamiento.

Capítulo 4: Discusión general.

Entre los factores que limitan la producción y la reproducción de la especie bovina en nuestras condiciones se encuentran las deficiencias nutricionales, que inciden negativamente sobre los indicadores reproductivos por lo que se hace necesario realizar el estudio de los perfiles metabólicos para determinar la existencia de estados carenciales, con el fin de realizar las correcciones de sus deficiencias acorde a los requerimientos de la vaca lechera en las diferentes fases del ciclo reproductivo, para que ésta pueda expresar su máxima producción láctea, mantener buen estado general y un óptimo comportamiento reproductivo (Álvarez, 2007).

En nuestro país se han estudiado los efectos de las carencias de los principios inmediatos en el balance de nutrientes de hembras bovinas en pastoreo, demostrándose que existen alternativas para solucionar las deficiencias de proteína (Reinoso *et al.*, 2005; Vargas, 2008) y energía (Díaz *et al.*, 1998), pero las mismas no solucionan las insuficiencias minerales, que son consideradas factor limitante de la productividad de los rebaños lecheros.

Para conocer con exactitud las deficiencias minerales se debe efectuar la determinación de los mismos en el ciclo integral del eje suelo-planta-animal (Kalmbacher *et al.*, 2005). Los resultados del primer experimento demostraron que la deficiencia de Cu fue la carencia de mayor incidencia en la zona de estudio, con el 100 % de las muestras de suelo y pasto deficientes en este microelemento. Se detectó además la hipocupremia en el 75% de los animales investigados y bajas concentraciones en el órgano de reserva (hígado) en el 72% de los sacrificados.

Aunque también fueron detectadas deficiencias de proteína, energía y Zn en novillas y vacas, fundamentalmente en el periodo poco lluvioso; los balances de nutrientes reflejan que la carencia de mayor magnitud resultó ser la de Cu, por lo que tomando en consideración que el factor más limitante es el que dicta la productividad (McDowell, 2005), el déficit de este microelemento puede ser responsabilizado con el deterioro de la situación reproductiva de los rebaños ubicados en la zona de estudio. La misma se caracterizaba por una elevada edad a la incorporación y al parto en las novillas y altos periodos interpartales con disminución del índice de natalidad en las vacas.

Esto concuerda con lo reportado por otros autores que han señalado que las gramíneas tropicales como único alimento no cubren los requerimientos de este mineral en las hembras bovinas lecheras (Bach y Devant, 2004; Ciria *et al.*, 2005) y que la relación de deficiencia de Cu en el suelo y el pasto, causan la hipocuprosis en una alta proporción de los animales que pastan en esas regiones

donde los rebaños presentan baja productividad, problemas de salud y reproductivos (Arthington y Kalmbacher, 2003; Salih *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2005).

Estos resultados dieron origen a plantearnos el tratamiento correctivo de la deficiencia de Cu, tomando como línea general de investigación la utilización de un fármaco genérico inyectable de Cu. En la literatura no existe un criterio único para establecer un tratamiento para esta carencia y aunque la suplementación oral ha brindado resultados satisfactorios (Muehlenbein *et al.*, 2001), a ésta se le han atribuido varias desventajas respecto a su absorción (Telfer *et al.*, 2005); por lo que se ha utilizado el tratamiento por vía parenteral (Brem *et al.*, 2002; Black y French, 2004).

En el tratamiento de la deficiencia de Cu por vía parenteral son frecuentes las intoxicaciones agudas (Barceloux, 1999), de ahí la importancia de efectuar las determinaciones de las concentraciones sanguíneas de las enzimas hepáticas ALAT, ASAT, GLDH y ALAP y de la bilirrubina, que han sido regularmente utilizados para evaluar el estado metabólico y el funcionamiento del hígado (Heathcote, 2000; Müller, 2001).

Atendiendo a estas consideraciones se desarrolló el segundo experimento, que demostró que la terapéutica empleada es eficaz para restablecer las concentraciones de Cu en sangre y tejido hepático, sin alterar la actividad enzimática del hígado y sin efectos residuales en la leche, lo que no la invalida para el consumo humano, evidenciando que el producto empleado posee alta eficacia y amplio margen de seguridad. Los resultados alcanzados en este experimento corroboran estudios anteriores, donde la aplicación de diferentes fármacos de Cu por vía parenteral en diferentes concentraciones ha aumentado los niveles de este mineral en tejido hepático sin la aparición de efectos tóxicos (Langlands *et al.*, 1998; Daugherty *et al.*, 2002).

El desarrollo del tercer experimento, se sustentó en la necesidad de evaluar la asociación entre los desordenes reproductivos en los rebaños lecheros con los niveles de minerales, especialmente de microelementos (Enjalbert *et al.*, 2006) y demostró una relación espontánea entre la cupremia y el comportamiento reproductivo, verificándose que la hipocupremia aumenta el riesgo relativo de presentar anestros, repetición de servicios o la sumatoria de ambos trastornos reproductivos, existiendo una correlación negativa y altamente significativa entre los valores de cobre en suero sanguíneo y los principales indicadores evaluados.

La relación hallada espontáneamente fue corroborada también de manera experimental con la administración de diferentes concentraciones de Cu, lo que nos permite afirmar que el deterioro del comportamiento reproductivo observado en el experimento 1 es una consecuencia de la alta prevalencia de la hipocupremia diagnosticada en el mismo y justifica los valores extremadamente altos de los índices reproductivos en las condiciones de explotación del ganado bovino en Cuba, donde existe una elevada proporción de animales con deficiencia de Cu (Pedroso, 2005). Los resultados de este experimento hacen suponer que la suplementación de Cu en hembras bovinas con diferentes niveles de cupremia debe ser efectiva aún en animales con valores de Cu séricos considerados normales.

En el cuarto experimento se seleccionó la dosis de 50 mg de Cu para suplementar a los animales, cuya eficacia fue probada en el experimento 3. El tratamiento resultó ser eficaz en hembras bovinas con deficiencia sérica de Cu y cíclicas incrementando la cupremia y el comportamiento reproductivo.

Se ha señalado la suplementación cúprica como uno de los métodos más eficaces para incrementar los indicadores de salud, productivos y reproductivos de los animales (Nocek *et al.*, 2000; Tomlinson *et al.*, 2001), no obstante la gran variedad de fuentes de Cu (orgánicas e inorgánicas) vías y formas de administración empleadas.

Varios estudios han demostrado una disminución en los días al primer servicio, servicios por concepción y mayores porcentajes de vacas gestantes a los 250 días de lactancia, en vacas suplementadas con fuentes de Cu orgánicas en comparación con las inorgánicas (Ballantine *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2004 a b).

También la combinación de varios microminerales, entre ellos el Cu durante dos años y utilizando los suplementos en una proporción, orgánico 50%: inorgánico 50% y 100% inorgánicos en forma de sulfatos, demostró que ambas fuentes incrementaron las proporciones de gestaciones tras las inseminaciones de los celos observados y la proporción de embarazo global a los 60 días de lactación en comparación con las controles; siendo superiores en los animales tratados con la combinación de ambas fuentes que en los que lo recibieron orgánicos solamente (Ahola *et al.*, 2004). Tratamientos similares han reducido los días al primer estro, al primer servicio, los servicios por concepción, el periodo de servicio y el intervalo interpartal, resultando mas efectivos aquellos que combinaban fuentes orgánicas e inorgánicas, que las que usaban por separado (Nocek *et al.*, 2006).

En novillas de primer servicio, con una preñez del 76%, el tratamiento con Cu inyectable aumentó el índice al 91% y Cu suministrado por vía oral al 82% (Correa Luna y Lagos, 1985); los efectos beneficiosos de ésta terapéutica fueron corroborados más tarde en un estudio efectuado en esta misma categoría, donde aumentó en un 20% las gestaciones con respecto a las testigos (Ricciardino *et al.*, 1998); con la que se ha logrado una disminución de los servicios por concepción de 2.5 a 1.7 (Kendall *et al.*, 2001). Posteriormente en vacas suplementadas con Cu por vía parenteral se observaron mayores números de celos, mejores tasas de servicio por concepción y elevación en los porcentajes de preñez (Brem *et al.*, 2002).

Más recientemente con el tratamiento con Cu inyectable se lograron intervalos parto primer estro y parto concepción de 55 y 114 días (Black y French, 2004). Estos resultados son superiores a los alcanzados en este trabajo dado que el mismo es realizado en otras condiciones de manejo y alimentación donde la dieta suministrada a los animales satisface todos los requerimientos de los mismos (energía, proteínas, vitaminas y minerales).

La alta incidencia de anestro en nuestros rebaños, demostrada en los experimentos 1 y 3, hace necesaria la utilización de tratamientos hormonales para la inducción del celo y prevención del anestro (Faure y Morales, 2003); estos tienen en la actualidad un amplio desarrollo y están en constante perfeccionamiento, para mejorar la fertilidad de los estros inducidos (Thatcher *et al.*, 2004). Sin embargo, en nuestras condiciones de producción, donde existe baja disponibilidad de alimentos y marcadas deficiencias minerales, especialmente de Cu, la eficiencia de los mismos ha sido baja (Pedroso, 2003); teniendo en cuenta esta problemática, se evaluó el efecto de la combinación de los tratamientos de inducción del celo en hembras bovinas anéstricas con la suplementación parenteral del Cu; demostrándose que la misma mejora la respuesta a los tratamientos inductivos.

Los factores que reducen la fertilidad de los celos inducidos con la combinación de progesterona y benzoato de estradiol en los animales anéstricos son: el pobre desarrollo del folículo e incremento de la atresia del folículo preovulatorio, no ocurrencia de la ovulación y pobre desarrollo del cuerpo lúteo (Pedroso, 2003). En tal sentido, aunque es necesario profundizar en los estudios con relación al Cu y la fertilidad, se ha planteado que este microelemento contribuye al aumento de la acción de las FSH y LH (Kochman *et al.*, 1992); además, el crecimiento de folículo preovulatorio es mediado por la actividad de la enzima Cu dependiente lisil oxidasa (Kendall *et al.*, 2003). Estos fenómenos benefician el desarrollo del folículo ovárico, la ovulación, formación del cuerpo lúteo, la secreción

de progesterona y la actividad secretora del endometrio (Pedroso, 2004). Estos eventos fisiológicos pueden favorecer la implantación y desarrollo del embrión y pueden explicar los resultados obtenidos en este experimento.

La eficacia del tratamiento en animales con concentraciones de Cu en suero sanguíneo consideradas normales se justifica por la relación existente entre los niveles de la cupremia y el comportamiento reproductivo, demostrada en el experimento 3 de ésta investigación. Por otra parte, varios estudios han demostrado que no existe correlación entre los niveles de Cu en suero sanguíneo y tejido hepático (órgano de reserva), por lo que en animales con valores de cupremia considerados normales se han diagnosticado altas proporciones de los mismos afectados de hipocuprosis global u orgánica general, en especial en los países tropicales, demostrándose que la misma no es un indicador exacto del estado cúprico en el organismo (Quiroz *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2006).

En el primer experimento de este trabajo se demostró que el 70 % de los animales con niveles séricos de Cu considerados normales presentaban deficiencia de este mineral en tejido hepático; por tanto, en esta situación la suplementación permite restaurar las reservas en este órgano y desde ahí movilizarla al resto del organismo para normalizar los procesos fisiológicos relacionados con él. Una vez que estos niveles y la capacidad de utilización del mismo por las células para cumplir a cabalidad sus funciones son saturados, el Cu excedente se almacena en los órganos de reservas, especialmente el hígado; esta situación justifica el hecho de que a partir de 14 μ mol/L la suplementación no halla sido efectiva sobre el comportamiento reproductivo, siendo éste limitado por otros factores dietéticos como la energía (Miyoshi *et al.*, 2001), las proteínas (López-Gatius *et al.*, 2001) y otros minerales (Córdova *et al.*, 2002).

A la luz de los resultados obtenidos en los experimentos 3 y 4 donde se demostró, primeramente la relación existente entre la deficiencia de Cu y los trastornos reproductivos y posteriormente un incremento del comportamiento reproductivo mediante el tratamiento con Cu parenteral en animales con diferentes valores de cupremia; el que además, disminuye el riesgo relativo de presentar anestro y repetición de servicio, consideramos corroborada la hipótesis de trabajo y la aceptamos, y al mismo tiempo, al contribuir estos resultados al mejoramiento de la eficiencia reproductiva de la hembra bovina consideramos cumplimentado el objetivo general de la hipótesis.

Conclusión general.

Se demostró la existencia de una correlación negativa entre la cupremia en un rango de 9.8 ± 1.0 a $14.0 \pm 0.9 \mu\text{mo/L}$ con los indicadores reproductivos, y la manipulación de dicha relación mediante la administración de 50 mg de Cu por vía parenteral en las hembras bovinas con niveles cupremia hasta $14 \mu\text{mol/L}$ incrementa la eficiencia reproductiva de las mismas.

Recomendaciones generales.

1. Ejecutar un estudio multicéntrico con una población mayor de animales que permita corroborar a nivel de productor los resultados obtenidos en el presente trabajo y realizar un análisis completo del costo beneficio.
2. Realizar estudios sobre la utilidad de la suplementación cúprica parenteral en otras categorías bovinas y especies animales de interés económico en las condiciones cubanas.
3. Efectuar las investigaciones necesarias para identificar con exactitud los mecanismos fisiológicos mediante los cuales el cobre interviene sobre el comportamiento reproductivo.

Aportes o novedades de la tesis.

1- Se realizan los primeros estudios y se demuestra la existencia de una correlación negativa entre la cupremia y los indicadores reproductivos de la hembra bovina y el rango en que se establece la misma (9.8 ± 1.0 a $14.0 \pm 0.9 \mu\text{mo/L}$), tanto en animales con cupremia espontánea como inducida; resultados que permiten explicar el bajo desempeño reproductivo observado en rebaños con deficiencia de Cu y la eficacia de la suplementación cúprica para mejorar los indicadores reproductivos.

2- Se evalúan por primera vez la magnitud real de los riesgos de los animales hipocuprémicos de padecer los trastornos reproductivos, expresándose los índices de los mismos para el anestro, la repetición de servicio y la sumatoria de ambos; que son una evidencia de la correlación encontrada. Estos estudios proporcionan otros parámetros de gran interés práctico, como son el riesgo atribuible (RA), que permite conocer que proporción de cada uno de los problemas estudiados dentro de la población total obedece a la hipocupremia; la fracción etiológica (FE), que representa que porcentaje de cada uno de ellos, dentro de los hipocuprémicos están asociados a este factor de exposición y la fracción etiológica de la población (FEP), que expresa el porcentaje de reducción de cada trastorno en los animales de la población total estudiada de instaurarse las medidas correctivas.

3- El trabajo ofrece los primeros resultados sobre el efecto de la asociación de la suplementación del Cu por vía parenteral con los tratamientos de inducción del estro en las hembras bovinas, utilizando con ese objetivo la combinación de P₄ y benzoato de estradiol (BE), demostrando que la cuproterapia parenteral potencia la respuesta de las mismas a dichos tratamientos hormonales del anestro.

4- Se estudia por primera vez, a partir de la manipulación de la correlación encontrada, el efecto de la suplementación del cobre por vía parenteral en animales normocuprémicos, demostrándose que la misma es eficiente hasta $14 \mu\text{mol/L}$, lo que indica que este constituye el nivel óptimo de cupremia para una adecuada eficiencia reproductiva de la hembra bovina, al menos en las condiciones de Cuba, y que son los límites críticos para obtener una respuesta beneficiosa con la suplementación cúprica; resultados que por su novedad, son de gran importancia, pues constituyen

un punto de partida en el estudio de la temática, especialmente para reconsiderar los valores de normalidad de este elemento para la especie bovina en las condiciones de nuestro país.

5- Se estudia y demuestran por primera vez las magnitudes reales del índice de riesgo en animales suplementados para el anestro, la repetición de servicio y la sumatoria de ambos trastornos reproductivos, que reflejan el efecto protector de la suplementación parenteral del Cu contra los mismos; además, estos estudios proporcionan otros indicadores de gran importancia práctica como son la reducción relativa del riesgo (RRR), la reducción absoluta del riesgo (RAR) y el número necesario de animales a tratar (NNT).

6- En el ámbito nacional constituye el estudio más integral de la deficiencia de cobre, diagnosticándose por primera vez los niveles de este elemento en el suelo, al igual que los demás microminerales, así como en el pasto, y el suero sanguíneo y las reservas hepáticas de los animales.

7- Se determinan por primera vez en Cuba, las concentraciones de Cu en la leche bovina.

Referencias bibliográficas.

- Ahola J.K.; Engle, T.E.; Baker, D.S.; Sharpe, L.R.; Burns, P.D.; Enns, R.M.; y Mortimer, R.G. (2003). Impact of trace mineral supplementation and source on grazing beef cattle over a two-year period. *J Anim.Sci.* 81(1): 36- 42.
- Ahola, J. K.; Baker, D. S.; Burns, P. D.; Mortimer, R. G.; Enns, R. M.; Whittier, J.; C. Geary, T. W. y Engle, T. E. (2004). Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. *J. Anim. Sci.* 82: 2375-2383.
- Ahola, J. K.; Engle, T.E.; and Burns, P.D. (2005). Effect of copper status, supplementation, and source on pituitary responsiveness to exogenous gonadotropin-releasing hormone in ovariectomized beef cows. *J. Anim. Sci.* 83: 1812-1823.
- Aiello SE. (1998). The Merck veterinary manual. 8th ed. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co.
- Alemán, R.; Cholaky, L.; Giayetto, O.; Machado, J y Fundora, O. (2002). Fertilización nitrogenada del girasol en suelos pardos con carbonatos de la región central de Cuba. *Centro agrícola.* 1 (11): 56- 63.
- Alfonso, A.; Figueroa, A.; García, T.; Rodríguez, I. y Donatién, M. (2007). Influencia de la época, momento del servicio post-parto y eficiencia del celaje sobre el comportamiento reproductivo del Siboney de Cuba. Memorias del Vi congreso de ciencias veterinarias, palacio de las convenciones, La Habana, Cuba. CD-ROM 978-959-282-047-3.
- Álvarez, J. L., (1997). La condición corporal de la hembra bovina. *Rev. Salud nim.* 19 (1):37 – 45.
- Álvarez, J.L. (2001). Bioquímica nutricional y metabólica en el trópico. Ediciones Universidad de Antioquia. Primera Edición, ISBN: 958-655-081-8. Medellín, Colombia: 1-28.
- Alvarez, J.L. (2007). Nutrición y fertilidad. II encuentro sobre reproducción animal. Memorias del VI Congreso internacional de ciencias veterinarias, La Habana, 10-13 de Abril de 2007. CD-ROM. ISBN 978-959-282-047-3.
- Amaral, A. (1972). Técnicas analíticas para evaluar macro nutrientes en cenizas de caña de azúcar. Laboratorio de la caña. Escuela de Química. Universidad de La Habana.
- AOAC. (1995). Official methods of analysis. 15 ed. Washington: Association of Official Agricultural Chemists: 1298- 1930.

- Arechiga, C. F.; Vazquez-Flores, S.; Ortiz, J. O.; Hernandez-Ceron, A.; Porras, L. R.; McDowell y Hansen, P. J. (1998). Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 50: 65–76.
- Arthington, J. D.; Corah, L. R.; Blecha, F y Hill, D. A. (1995 a). Effect of copper depletion and repletion on lymphocyte blastogenesis and neutrophil bactericidal function in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 73: 2079–2085.
- Arthington, J. D.; Larson, R. L. y Corah, L. R. (1995 b). The effects of slow-release copper boluses on cow reproductive performance and calf growth. *Prof. Anim. Scientist* 11: 219–222.
- Arthington, J.D.; Pate, F.M. y Spears, J.W. (2003). Effect of copper source and level on performance and copper status of cattle consuming molasses supplements. *J. Anim. Sci.* 81: 1357-1362.
- Arthington, J.D.; y Brown, W. F. (2001). The effect of copper oxide bolus administration on forage fiber digestibility in growing steers. *J. Anim. Sci.* 79(1): 422-430.
- Arthington, J.D. y Brown, W.F. (2005). Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. *J. Anim. Sci.* 83: 1726-1731.
- Arthington, J.D. y Kalmbacher, R.S. (2003). Effect of early weaning on beef cow and calf performance in the subtropics. *J. Anim. Sci.* 81: 1136-1141.
- Arthington, J.D. y Pate, F.M. (2002). Effect of corn- versus molasses-based supplements on trace mineral absorption in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 80: 2787-2791.
- Arthington, J.D. y Swenson, C.K. (2004). Effects of trace mineral source and feeding method on the productivity of grazing Braford cows. *Prof. Anim. Sci.* 20: 155-161.
- Arthington, J. (2003). Mineral antagonisms may influence copper deficiencies. *Feedstuffs.* 75 (24): 11 - 17.
- Arthington, J.D. (2005). Effects of high-level copper supplementation or copper oxide bolus administration on forage utilization and copper status in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83:2894-2900.
- Atkinson, D; Beasley, M. y Dryburgh, P. (2004). Accidental subcutaneous copper salt injection: toxic effects and management. *Journal of the New Zealand Medical Association,* 117: 1190-1194.
- Attaelmannan, M. A. y Reid, R. S. (1996). The speciation of lysine-complexed copper as a bovine nutritional supplement. *J. Inorg. Biochem.* 64: 215–224.

- Avila GJ.; Bouda, J.; Quiroz R.G.F y Yabuta O.A. (1997). Impacto de deficiencias minerales sobre la reproducción de vacas lecheras. Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatria; 1997 Julio 9-12; Colima (Colima) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC: 191-193.
- Bach, A. Y Devant, Maria. (2004). Microminerales en la nutrición de rumiantes: Aspectos técnicos y consideraciones legales. XX curso de especialización. Avances en nutrición y alimentación animal. FEDNA. Disponible en URL: http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/04CAP_12.pdf [accedido 20/01/06].
- Bach, A., (2002). La reproducción del vacuno lechero: Nutrición y fisiología. XVII Curso de Especialización. Avances en nutrición y alimentación animal. FEDNA. Purina, España. Disponible en URL: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/2001CAPV.pdf> [accedido 22/01/06].
- Badiei, K. (1998). Comparative measurement of copper in different anatomical locations of liver in goats. Proceedings of the 10th International Conference of Production Diseases in Farm Animals Utrecht, Amsterdam the Netherlands. European Society of Animal Production. August 24-28, 1998.
- Baker D.S.; Ahola, J.K.; Burns, P.D. y Engle. T.E. (2003). Trace mineral metabolism in ruminants: impact on production, reproduction and the environment. In: Beyond the Tornado: The Calm after the Storm. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Eds: TP Lyons and KA Jacques. Nottingham University Press, Nottingham, UK: 275-287.
- Balbuena, O.; McDowell, L. R. y Stahringer, R. C. (1999). Suplementación con cobre inyectable en terneros y vacas con hipocupremia. *Vet. Arg.* 16 (154): 272-280.
- Ballantine, H. T.; Socha, M. T.; Dplacan; Tomlinson, D. J.; Johnson, A. B.; Fielding, A. S.; Shearer, J. K. y Van Amstel, S. R. (2002). Effects of Feeding Complexed Zinc, Manganese, Copper, and Cobalt to Late Gestation and Lactating Dairy Cows on Claw Integrity, Reproduction, and Lactation Performance. *The Professional Anim. Sci.* 18: 211-218.
- Barboza, P.S. y Blake, R.T. (2001). Seasonality of sexual segregation in dimorphic deer: extending the gastrocentric model. *Alces* 37: 275-292.
- Barceloux, D.G. (1999). Copper. *J Clin Toxicol.* 37: 217-230.
- Bavera, G. A. (2000). Suplementación mineral del bovino a pastoreo y referencias al ganado de engorde a corral. 2da ed Edit. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. ISBN 987 - 43 - 2113- X.

- Berger, L. L. (2000). Effective copper nutrition for farm animals. Disponible en URL: http://www.geocities.com/raydelpino_2000 [accedido 18/01/06].
- Berry, S.L. (1997). Incentivos para mejorar la Reproducción reduciendo los días abiertos. Universidad de California: 1-3.
- Bertinato, J.; Iskandar, Monica y L'Abbe, Mary. (2003) Copper Deficiency Induces the Upregulation of the Copper Chaperone for Cu/Zn Superoxide Dismutase in Weanling Male Rats. *J. Nutr.* 133: 28-31.
- Bingley, J.B.; Ruksan, B. Y Carrillo, B. (1978). Estudios sobre hipocuprosis en la región de la Pampa húmeda en la provincia de Buenos Aires. *Rev.Med. Vet.* 59: 63-67.
- Black DH y French NP. (2004). Effects of three types of trace element supplementation on the fertility of three commercial dairy herds. *Vet Rec.* 154 (21): 652-8.
- Blakley, B.R.; Kutz, S.J.; Tedesco, S.C. y Flood, P.F., (2000). Trace mineral and vitamin concentrations in the liver and serum of wild muskoxen from Victoria Island. *J. Wildl. Dis.* 36: 301–307.
- Blanco A. (1989). Química biológica, 5ta. Edición, Ed. El Ateneo. Buenos Aires: 278-279.
- Blanco, G.S. (1998). Evaluación Reproductiva. Su importancia. IV Jornada de Ciencias Médico Veterinarias. Universidad Realística de México. Cholula. Puebla. México. 1998.
- Blanco, G.S. (2000). Solución de problemas reproductivos en la vaca. Facultad de Medicina Veterinaria UNAH: 1-28.
- Blood, D.C. y Radostits, O.M. (1994). Medicina Veterinaria. Nueva Edit. Interamericana, 7ª edic., México, II: 1296-1300.
- Bohman, V.R.; Poole, S.C. y Kvasnicka, W.G. (1987).The toxicology and composition of bovine tissues after parenteral administration of high levels of copper salts. *Vet Hum Toxicol.* 29: 307 – 312.
- Boila, R.J. ; Devlin, T.J. ; Drysdale, R.A. y Lillie, L.E. (1984). The severity of hypocupremia in selected herds of beef cattle in northwestern Manitoba. *Can J Anim Sci.* 64: 162 - 169.
- Bolasell, D. (2006). Evaluación de distintas fuentes de cobre opara rumiantes. Disponible en URL: http://www.engormix.com/evaluacion_distintas_fuentes_cobre_s_articulos_559_GDC.htm. [accedido 13/09/06].
- Borsberry, S., y H. Dobson. (1989). Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet. Rec.* 124: 217–219.

- Bouda, J.; Gutiérrez, Ch. A.; Salgado, H. G.; Kawabata, G. K. K., (2005). Monitoreo, diagnóstico y prevención de trastornos metabólicos en vacas lecheras. Disponible en URL: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgCliG005.pdf> [accedido el 1/06/ 06].
- Brem,J.J.; Pochon, D.O.; y Trulls, H.E. (1995). Evaluación del ciclo estral por progesterona sanguínea en bovinos bajo condiciones metabólicas diferentes de cobre-molibdeno”. VIII octava Jornada Veterinaria de Corrientes, Argentina (JOVECOR-8). Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE.
- Brem, J. J.; Mestre, J.; Pochon, D. O. y Trulls, H. E., (2002). Alteraciones del ciclo estral provocadas por un alto ingreso de molibdeno en vaquillonas Brangus y respuesta a la suplementación con cobre. *Rev. Vet.* 12 (1): 28-33.
- Bremmer, I.; Humpheries, W. R.; Phillip, M.; Walker, M. J. y Morrice, P. C. (1987). Iron - Induced Copper Deficiency in Calves: Dose-responce relationships and interactions with molybdenum and sulphur. *Anim. Prod.* 45: 403-414.
- Brito, R. (2001). Patología de Reproducción Animal. Ed. Félix Varela. La Habana. Cuba.
- Buckley WT. (1991). A kinetic model of copper metabolism in lactating dairy cows. *Can J Anim Sci* 71: 155-166.
- Buffarini, M. A.; Homse, A. C. y Cseh, S. (1997). Efecto de la administración parenteral de cobre y cinc sobre la ganancia de peso y los niveles séricos de cobre y cinc en novillos. *Rev. Arg. Prod. Anim.*, 17 (1): 307- 316.
- Bulgin, M.S.; Maas, J.; Anderson, B.C.; Klugh, D.; Lincoln, S.D. y Lane, V.M. (1986). Death associated with parenteral administration of copper disodium edetate in calves. *J.A.V.M.A* 188: 406- 409.
- Butler, W.R. (1998). Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81: 2533-2542.
- Butler, W.R. (2000a). Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79: 840-845.
- Butler, W.R. (2000b). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science.* 60-61: 449-456.
- Cairo. C. P, y Fundora. H. O. (2005). Edafología. Primera Parte. Editorial “Félix Varela”. La Habana. Cuba: 265.
- CALRAC. (1996). Software para la alimentación de rumiantes, VER 1.0.

- Cameron, H. J.; Boila, R. J.; McNichol, L. W. y Stanger, N. E. (1989). Cupric oxide needles for grazing cattle consuming low-copper, high-molybdenum forage and high-sulfate water. *J. Anim. Sci.* 67: 252–261.
- Campos, R.; Cubillos, Carolina y Rodas, Angela. (2007). Indicadores metabólicos en razas lecheras especializadas en condiciones tropicales de Colombia. *Acta Agron.* 56 (2): 85-92.
- Cantón Castillo, J. G.; Moguer, Y.; Rojas, O.; Sauri, E.; Miranda, J. y Castellanos, A. F. (1994). Estimación del daño inducido por el cobre de la pollinaza empleada en la alimentación de ovinos. *Tec. Pecu. Mex.*, 32(2): 82-89.
- Cao, J.; Henry, P.R.; Guo, R.; Holwerda, R.K.; Toth, J.P.; Littell, R.C.; Miles, RD, Ammerman, C.B. (2000). Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *J Anim Sci* 78: 2039-2054.
- Cappa, V. (1993). Alimentación y fertilidad en los bovinos (I). *Mundo Ganadero.* 6: 45.
- Cardoso, E.C.; Pereira, W.L.A.; Aquiar, F.C.O.; Pereira, F.C.C.; McDowell, L.R., (2001). Hypochromic anaemia related to copper deficiency in buffaloes from Marajo island. Para state. Brazil Internacional. *J Anim. Sci.* 76: 19–23.
- Carfagnini. (1998). Evaluación de la administración de glicinato de cobre sobre los niveles plasmáticos y hepáticos de cobre en novillos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18 (1): 316-317.
- Carrera, R.; García, P.; Prieto, F.; Toría, R.; Gutiérrez, C. y Benedito, J.L. (2000). Niveles de cobre y cinc en novillas de raza Parda Alpina en la montaña de León. Importancia de la edad. 8° Congreso Internacional de la Fe.Me.S.P.Rum. Sicilia (Italia), 2000.
- Carstens, G.E. (1999). Trace mineral nutrition to optimize health and survival of newborn calves. Zinpro National Annual Conference, USA.
- Castelli, Mirta.; Grosso, E.; Quaino, O. y Warnke, O. (2001). Evaluación de Diferentes Productos Comerciales de Aplicación Parenteral en el Tratamiento de la Hipocuprosis en Bovinos. Anuario de Producción Animal. Congreso Argentino de Producción Animal. Rafaela, 19 al 21 de septiembre de 2001. (1-2).
- Ceballos, A.; Gómez, P. M.; Veliz, M. L.; Villa, Nayvi y López, L. F. (2002). Variación de los indicadores bioquímicos del balance de energía según el estado productivo en bovinos lecheros de Manizales. Colombia. *Rev.Cienc. Pec* 15: 13 – 25.
- Cerone, S.I., Sansinanea, A.S., Streitenberg, S.A., Garcý'a, M.C. y Auza, N.J. (2000a) Cytochrome c-oxidase, Cu,Zn-superoxide dismutase and caeruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol. Trace. Element Res.* 73: 269-278.

- Cerone, S.I., Sansinanea, A.S., Streitenberg, S.A., Garcý'a, M.C. y Auza, N.J. (2000b) Bovine monocyte-derived macrophage function in induced copper deficiency. *Gen. Physiol. Biophys.* 19: 49-58.
- Ciria, J.; Villanueva, R.; Y Ciria, J. (2005). Avances en la nutrición mineral del ganado bovino.IX seminario de ástos y forrajes: 50-69.
- Colomé, H.; Lam, F.; Gonz160lez, A.M. y Mayarí, R. (1989). Hallazgos hematoquímicos y morfológicos en bovinos alimentados con residuos de centros de limpieza de caña de azucar. *Rev. Salud anim.* 11: 223-237.
- Corbellini, C. N. y Carrillo, B. J. (1985). Avances en sanidad animal y su aplicación en el diagnóstico y control de enfermedades de bovinos; II Avances en enfermedades tóxicas, nutricionales y metabólicas en bovinos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 5 (7): 481-504.
- Corbellini, C. N. (1998). Influencia de los micronutrientes en la fertilidad en bovinos lecheros; 2ª parte. *Rev. Med. Vet.*, 79(3): 231-236.
- Córdova, A.; Sánchez, Y.M.; Leal, A.J.; Muñoz, C.R. y Murillo, A.L. (2002). Causas de infertilidad en el ganado bovino. *Med vet*, 19 (9): 112-124.
- Correa Luna, M. y Lagos, F. (1985). Efecto del molibdeno y del cobre en la producción de bovinos para carne en los bajos submeridionales. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4 (3): 199-201.
- Correa, C.J. Relación Producción, Reproducción de Alto Potencial Genético. (2000). Disponible en URL: <http://www.reproduccionavanzada.com>. [accedido 1/06/06].
- Costa, E.F.; Giulodori M.J.; Titarelli, C.M.; Mattioli, G.A. y Ramirez, C.E. (1999) Intoxicación aguda con cobre en terneros y su posible patogenia. *Rev. Therios* 28: 167-171.
- Costa, E. F.; Fazzio, L. E.; Traveria, G. E.; Sánchez, R. O.; Alvarado - Pinedo, M .F.; Mattioli, G. A.; Otero, M. M.; Chialva, M.; Romero, J. R., (2003). Causas de mortandad y abortos en bovinos - Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la Provincia de Buenos Aires. *Rev. Med. Vet.* 21 (11): 121-129.
- Creech, B. L.; Spears, J.W.; Flowers, W.L.; Hill, G.M.; Lloyd, K.E.; Armstrong, T. A. y Engle, T.E. (2004). Effects of trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs for weaning through finishing. *J. Anim. Sci.* 82: 2140-2147.

- Crespo, G y Duran J. L. (1990). Vías para disminuir el déficit de fertilizantes y la erosión de los suelos. Seminario científico internacional XXV aniversario del Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba: 32.
- Cseh, S.; Odriozola, E. y Reynal, J. (1998). Perfil mineral en vaca de cría en los partidos de Puan y Saavedra, provincia de Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18 (1): 315-316.
- Cuesta, M. (2003). Medicina Interna Veterinaria. Libro de texto, UCLV. ISBN 959-250-105- X.
- Cuesta, M.; Cuesta, Axis.; Gil, L. y García, JR. (2003). Condición corporal de las vacas lecheras y su relación con indicadores productivos, de reproducción, de la calidad de la leche y parámetros de bioactividad ruminal y sanguíneos. Segunda conferencia internacional sobre desarrollo agropecuario y sostenibilidad Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
- Culotta, V.C.; Klomp, L.W.; Strain, J.; Casareno, R.L.; Krems, B.; and Gitlin, J.D. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272: 23469–23472.
- Charmley, L.L.; Symonds, H.W. y Mallison, C.B. (1982). The clearance of copper from the plasma of cattle and its excretion in bile during the intravenous infusion of copper sulfate solution. *Proc Nutr Soc* 41: 81A.
- Chebel, R.C.; Santos, J.E.; Reynolds, J.P.; Cerri, R.L.; Juchem, S.O. y Overton, M. (2004). Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 239-255.
- Da Silva, M.S.; Hubinger T.C. y Döbereiner J. (1999). Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. *Pesq Vet Bras* 19: 19-33.
- Dargatz, D.A.; Garry, F.B.; Clark, G.B. y Ross, P.F. (1999): Serum Copper concentrations in beef cows and heifers. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 215: 1828–1832.
- Daugherty, S.R.; Carstens, G.E.; Herd, D.B.; Barling, K.S. y Randel, R.D. (2002). Effects of Prenatal and Prebreeding Trace Mineral/Vitamin E injections on Calf Health and Reproductive Performance of Beef Cows. Texas A&M 2002/2003 Beef Cattle Research in Texas: 39-43.
- Davis, P.A.; Kunkle, W.E.; McDowell, L.R.; y Arthington, J.D. (2003). Case Study: Effects of liquid supplement feeder wheel width and turning capability on supplement intake by beef heifers. *Prof. Anim. Sci.* 19: 321-325.
- Davis, M. (2004). Control del estro y la ovulación mediante el uso combinado de progesterona y benzoato de estradiol para mejorar la reproducción en hembras bovinas anéstricas en clima tropical. Tesis MSc. CIMA. La Habana, Cuba.

- Del Pino, R. (2000). Problemas que Frecuentemente pueden estar Relacionados con la Nutrición. Problemas de la reproducción. Disponible en URL: http://www.geocities.com/raydelpino_2000/salud.html [accedido 10/01/06].
- Descalzo, J.M. (2003). Diagnóstico y Tratamiento de la Hipocuprosis en Bovinos. Carfagnini. Argentina. Titular del Área de Patología Facultad de .Ciencias.Veterinarias. UBA. Disponible en URL: http://www.engormix.com/extrusion_semilla_algodon_%E2%80%93s_articulos_436_BAL.htm [accedido 1/06/06].
- Díaz, R.F.; Vargas, S.; Franco, R.; Brizuela, Maria Antonieta. (1998). Producción bovina sostenible. Editorial ACPA: 116-121.
- Dickinson, E.K.; Adams, D.L.; Schon, E.A. y Glerum, D.M. (2000) A human *SCO2* mutation helps define the role of *SCO1p* in the cytochrome oxidase assembly pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 26780–26785
- Drabkin, (1970). Manual de Técnicas de Laboratorio Clínico. MINSAP.
- Du Plessis, S.S.; Van Niekerk, F.E. y Coetzer, W.A. (1999b). The effect of dietary molybdenum and sulphate on the sexual activity and plasma progesterone concentrations of ewes *Small Ruminant Research* 33: 71–76.
- Du Plessis, SS.; Van Niekerk, F.E y Coetzer, W.A. (1999a) The effect of dietary molybdenum and sulphate on the oestrus cycle and ovulation in ewes after manipulation with exogenous progesterone alone or in combination with FSH and LH. *Small Ruminant Research* 33: 63–69.
- Du, Z.; Hemken, R.W.; Jackson, J.A.; y Trammell, D.S. (1996). Utilization of copper in copper proteinate, copper lysine, and cupric sulfate using the rat as an experimental model. *J. Anim. Sci.* 74: 1657–1663.
- Eckert, G. E.; Greene, L.W.; Carstens, G.E. y Ramsey, W.S. (1999). Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. *J. Anim. Sci.* 77: 244–249
- EMEA. (1998). Copper Chloride, Copper Gluconate, Copper Heptanoate, Copper Oxide, Copper Methionate, Copper Sulphate and Dicopper Oxide Summary Report. Committee for Veterinary Medicinal Products, London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Disponible en URL: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/043198en.pdf> [accedido 10/06/06].

- Engle, T.E.; Fellner, V. y Spears, J.W. (2001): Cooper status, serum cholesterol, and milk fatty acid profile in Holstein cows fed varying concentrations of copper. *J Dairy Sci* 84: 2308-2313.
- Engle, T.E.; and Spears, J.W. (2000). Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78: 2446–2451.
- Enjalbert, f.; Lebreton, P.; Salat, O.; Meschy, F. y Schelcher, F. (2002): Effects of copper supplementation on the copper status of peripartum beef c/ows and their calves. *Vet Rec* 151: 50-53.
- Enjalbert, F.; Lebreton, P. y Salat, O. (2006). Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: retrospective study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90: 459–466.
- Espinoza, J.E.; McDowell, L.R.; Wilkinson, N.S.; Conrad, J.H. y Martin, F.G. (1991). Forage and soil mineral concentrations over a three-year period in a warm climate region of central Florida. II. Trace mineral. *Livestock Research For Rural Development.* 3 (1): 43 - 52.
- Fajardo, H. Viamonte, María I.; Rondón, G.; Sánchez, Magdalena y Constenla, Lourdes. (2000): Principales factores asociados a algunas alteraciones metabólicas en novillas y vacas lecheras. En: Memorias del I Congreso Internacional sobre Mejoramiento Animal. La Habana: 185-190.
- Fajardo, H.; Viamonte, María I.; Rondón, G.; Aliaga, Ania.; Leyva, Marilín.; Sánchez, Magdalena. y Constenla, Lourdes. (2004). Procedimientos para el control de la reproducción en rebaños bovinos de leche. Memorias del II Congreso Internacional de Agricultura En Ecosistemas Frágiles y Degradados. Bayamo, Granma, Cuba 1-3 de diciembre del 2004.
- Faure, R.; Fernández, O.; Alonso, J.L. y Gil, A. (1996). Concentraciones de progesterona sérica e inducción del estro fértil con la inducción de dosis bajas de esta hormona en novillas anéstricas. *Rev. Cub. Salud. Anim.* 18: 39-44.
- Faure, R. y Morales, C. (2003). La pubertad en la hembra bovina: II. Aspectos productivos. *Rev salud anim,* 25 (2): 83-90.
- Fazzio, L. E.; Mattioli, G.A.; Picco, S.J.; Traveria, G.E.; Costa, E.F.; Romero, J.R. (2003). Intoxicacion aguda con cobre inyectable en bovinos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Disponible en URL: <http://www.fcv.unlp.edu.ar/centros-lab-inst/cedive/temas/intoxicacion.php>. [accedido 1/06/06].
- Ferguson, J.D. & Chalupa, W. 1989. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:746.

- Ferguson, J. D., D. Tomlinson, and M. Socha. (2004a). Effects of inorganic and organic (4-PlexR) trace mineral supplementation on milk production and reproduction. *J. Dairy Sci.* 87(1): 117. (Abstr.).
- Ferguson, J. D., D. Tomlinson, and M. Socha. (2004b). Effects of inorganic and organic (4-PlexR) trace mineral supplementation on claw lesions. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1):117. (Abstr.)
- Ferrer, C.G.; Ramírez, C.E. y Zaccardi, E.M. (1989). Efectos de la Suplementación parenteral con cobre sobre la ganancia diaria de peso en bovinos de diferentes edades. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 9 (3): 173-178.
- Fetrow, J.; Stewart, S. y Eicker, S.(1997). Reproductive health programs for dairy herds: anlysis of record for assessment of reproductive performance In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Ed. Youngquist R. 1st ed. Saunders Company: 441-450.
- Forero, L. (2000). Concepto sobre metritis bovina. [en línea]. Disponible en URL: <http://www.Laboratoriosprovet.com.co/inftecnica/PATOLOGIA/metritis.asp>. [accedido 8/04/05].
- Fourichon, C.; Seegers, H. y Malher, X. (2000). Effect of disease on reproduction in the dairy cow: A meta-analysis. *Theriogenology* 53 (6): 1729–1759.
- Fundora, O y Yepis, Olga. (2000). Ahorro de fertilizantes en empresas de cultivos varios y limitación de la contaminación ambiental. XIII forum de ciencia y técnica. Santa Clara, Cuba.
- Galey, F.D.; Maas, J.; Tronstad, R.J.; Woods, L.W.; Littlefield, E.S.; Wallstrum, R. and Dorius, L.C. (1991). Copper toxicosis in two herds of calves following injection with copper disodium edetate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 260-263.
- Gallego, M.I. (1998). Evaluación reproductiva del ganado lechero. En: Reproducción animal: métodos de estudio en sistemas. (Eds. Ruiz, M.E.; Rivera, B. & Ruiz, A.). IICA-RISPAL. San José, Costa Rica: 111- 113.
- García, M.; Goodger, T.; Bennett, W.J.; Perera, A.O. (2001). Use a standardized protocol to identify factors affecting the efficiency of artificial insemination service for cattle through progesterone measurement in fourteen countries . IAEATECDOC- 1220: 173-184.
- García, JR.; Cuesta, M. y Pedroso, R. (2005). Administración de sulfato de cobre sobre la hemoquímica, hematología y bioactividad del líquido ruminal en vacas. *Rev. MVZ-Córdoba*; 10 (2): 639-647.

- García, J.R.; Cuesta, M.; Pedroso, R.; Rodríguez, Janhad.; Gutiérrez, Marisol.; Mollineda, A.; Figueredo, J.M. y Quiñones, R. (2007). Suplementación parenteral de cobre en vacas gestantes: Efecto sobre postparto y terneros. *Rev.MVZ Córdoba* 12(2): 985-995.
- García, J. R y Cuesta, M., (2004) Diagnostico y tratamiento de la deficiencia de cobre y su efecto sobre la reproducción y el estado de salud de las hembras bovinas. Memorias del II Congreso Internacional de Agricultura En Ecosistemas Frágiles y Degradados. Bayamo, Granma, Cuba 1 – 3 de diciembre del 2004.
- Garrick, M.D.; Nuñez, M.T.; Olivares, M. y Harris, E.D. (2003). Parallels and contrasts between iron and copper metabolism. *BioMetals* 16: 1-8.
- Gartenberg, P. K.; McDowell, L.R.; Rodriguez, D.; Wilkinson, N.; Conrad, J.H. y Martin, F.G. (1990). Evaluation of the trace mineral status of ruminants in northeast Mexico. *Livestock Research For Rural Development*. 2 (1): 36 – 44.
- Gartner, R. J. W.; Mc Lean, R. N.; Little, D. A. y Winks, L. (1980). Mineral deficiencies limiting production of ruminants grazing tropical pastures in Australia. *Tropical Grasslands* 14 (3):266-272.
- Gaskin, Julia W.; Brobst, R. B.; Miller, W. P.; y Tollner, E. W. (2003). Long-Term Biosolids Application Effects on Metal Concentrations in Soil and Bermudagrass Forage. *Journal of Environmental Quality* 32:146-152.
- Gay, C.C.; Pritchett, L.C. y Madson, W. (1988). Copper deficiency incattle: a review. Proceedings of the 20th Annual Meeting of the American Association of Bovine Practitioners; September 18-21; Kansas City (Ka). Rome (Ge): *American Association of Bovine Practitioner*: 134-138.
- Gebhard, S.; Ronimus, R.S. y Morgan, H.W. (2001) Inhibition of phosphofructokinases by copper(II). *FEMS Microbiol. Lett.* 197: 105–109.
- Gee, E.K.; Grace, N.D.; Firth, E.C y Fennessy, P.F. (2000). Changes in liver copper concentration of Thoroughbred foals from birth to 160 days of age and the effect of prenatal copper supplementation of their dams. *Aust Vet J.* 78: 347-353.
- Gengelbach, G.P.; Ward, J.D y Spears JW. (1994). Effect of di-etary copper, iron, and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. *J Anim Sci* 72: 2722-2727.
- Gersliwin, M. E.; Keen, C. L.; Fletcie, M. P. y Vil, S. (1988). Trace element deficiencies and immune responsiveness in man and 3 animals. Hurley. New York and London: 85 – 90.

- Gierus, M.; Schwarz, F.J. y Kirchgessner M. (2003): Investigation on selenium supplementation for dairy cows in late pregnancy. *Zuchtungskunde*, 75: 88–100.
- Goldfrank, L.R.; Flomenbaum, N.E.; Lewin, N.A. (1998). Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 6th edition. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange: 364-366.
- Gonzalez-Stagnaro, C.; Goicochea, J.; Rodríguez, M. A.; Madrid-Bury, N. y González, D. (2006). Incorporación al servicio en novillas mestizas doble propósito. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 14 (1): 1-9.
- González, Noelia. (1982). Contribución al estudio del metabolismo mineral de la novilla lechera y su relación con la reproducción. Tesis para la obtención del grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. ICA. La Habana. 1982.
- González, Noelia.; Gerrken, C.; Pedroso, R. y Lavandeira, L. (1984). Composición mineral en tejidos de novilla $\frac{3}{4}$ BS $\frac{1}{4}$ C. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 4: 35-46.
- González, Noelia.; Lavandeira, L.E. y Candebat, L.A. (1987). Efecto de la gestación en el balance ácido básico y mineral de novillas mestizas Brown Swiss x Cebu *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 13 (2): 7-15.
- González, Noelia.; Lavandeira, L.E. y Pedroso, R. (1988). Incidencia de deficiencias minerales en áreas ganaderas de Cuba y utilización de mezclas minerales "abiertas" como método de combatirlas. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 19:73-80.
- González, F. H. D. (2002). Udo do perfil metabólico de ruminantes no diagnóstico de doenças metabólico- nutricionais em reumiantes..Im González, F. H. D.; Barcellos, J.; Ospina, H.; Riveiro, L (eds) *Perfil metabólico de ruminantes*. Porto Alegre: RS: UFRGS: 89-106.
- Gooneratne, S.R.; Buckley, W.T. y Christensen, D.A. (1989). Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can J Anim Sci* 69: 819-845.
- Gooneratne, S. R.; Symonds, H. W.; Bailey, J. V. y Christensen, D. A. (1994). Effects of dietary copper, molybdenum and sulfur on biliary copper and zinc excretion in Simmental and Angus cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 315–325.
- Grace, ND.; Wilson, P.R. y Thomas, WJ. (2001). Effect of topdressing with copper on the copper status of young red deer (*Cervus elaphus*). Proceedings of a Deer Course for Veterinarians, No. 18, Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association: 117–21.
- Grace, ND y Wilson, P. R. (2002). Trace element metabolism, dietary requirements, diagnosis and prevention of deficiencies in deer. *New Zealand Veterinary Journal* 50(6): 252-259.

- Grant, R. y Keown, J. (1997). Uso del programa de análisis del rebaño lechero para localizar problemas de manejo. Extention Dairy Slpecialist. Dpto Animal Sciences, University of Nebraska, Lincon, N.E: 68583-0908.
- Grohn, Y.T. y Rajala-Schultz, P.J. (2000). Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 605-614.
- Guetens, G.; De Boeck, G.; Highley, M.; van Oosterom, A.T. y de Bruijn, E.A. (2002). Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 39: 331-457.
- Gutiérrez, Odilia.; Crespo, G.; Oramas, A.; Cairo, J. y Fraga, S. (2006). Situación actual del status mineral en áreas ganaderas del occidente de Cuba. Memorias del III Congreso Internacional de Agricultura en Ecosistemas Frágiles y degradados. Bayamo, Granma, Cuba 10-13 de Diciembre del 2006. ISBN 959- 7189-06-2.
- Gutiérrez, Odilia. (2007). Retos y perspectivas de la utilización de los minerales orgánicos en la alimentación animal. Memorias del VI Congreso internacional de ciencias veterinarias. CD-ROM. ISBN 978-959-282-047-3.
- Gutiérrez, Marisol. (2004) Diagnostico de los niveles hemoquimicos y hematológicos. Tesis presentada en opción al titulo de master en medicina veterinaria preventiva. Departamento de medicina veterinaria. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central de las Villas.
- Hafez, E.S. (1996). Reproducción e inseminación artificial. 4th Ed, Mc Graw Hill Interamericana: 203-225.
- Harlow, C.R.; Rae, M.; Davidson, L.; Trackman, P.C. y Hillier, S.G. (2003). Lysyl oxidase gene expression and enzyme activity in the rat ovary: regulation by follicle-stimulating hormone, androgen, and transforming growth factor-beta superfamily members *in vitro*. *Endocrinology* 144: 154-162.
- Haro, I.M (1986). Determination of mineral deficiencies and/or toxicities in three regions in Coahuila, Mexico. M.S. Thesis, Agrarian University "Antonio Narro", Saltillo, Coahuila, Mexico
- Harris, ED (1991). Copper transport: an overview. *Proc Soc Exp Biol Med.* 196: 130-140.
- Harris, E. (2003). Basic and Clinical Aspects of Copper. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. Disponible en URL: <http://www.iqb.es/nutricion/cobre/cobre.htm>. [accedido 5/06/06].

- Haydock, P. y Shaw, N.H. (1975). The comparative field method for estimation dry matter yield of pasture. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 15: 663.
- Heathcote, E.J. (2000). Management of primary biliary cirrosis. The american association for the study of liver diseases practice guidelines. *Hepatology.* 31: 1005 – 1013.
- Hellman, N. E. y Gitlin, J. D. (2002) Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 439-458.
- Hernández, A.; Ascanio, M. O. y Morales, M. (2001). Clasificación de los suelos en Cuba. Inst. de Suelos. Ministerio de la Agricultura: (14).
- Hernández, D.; Carballo, Mirta y Reyes, S. (1997). Desarrollo de las hembras de cría a base de pasto. *Pasto y Forraje.* 20: 175- 181.
- Hernández, I.; Benavides, J.E.; Simón, L. y Pérez, E. (2000). Efecto de la adición en el suelo de *Leucaena leucocephala* en la producción de biomasa de *Panicum maximum*. Pastos y forrajes. 23: 225-232.
- Hernández, A y Pérez, J.M. (1975). II Clasificación genética de los suelos de Cuba. Consejo editorial, Academia de ciencias de Cuba. La Habana, Cuba.
- Hernández, A. (2006). Respuesta al stres por calor de la vaca criolla lechera tropical, estructura genética de algunas variables polimórficas y sus relaciones con el comportamiento biorreproductivo en Veracruz, México. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias veterinarias. CENSA, La Habana, Julio de 2006.
- Heron, P.; Cousins, K.; Boyd, C.; y Daya, S. (2001) Paradoxical effects of copper and manganese on brain mitochondrial function. *Life Sci.* 68; 1575–1583.
- Hiser, L.; Di Valentin, M.; Hamer, A.G. y Hosler, J.P. (2000) Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* 275: 619–623
- Holmes, I. (2005). JD, Soils & Minerals. Technical pamphlet by Dr Ian Holmes, District Veterinary Officer, Echuca, Department of Primary Industries, Victoria, Australia.
- Holy, L.: (1987). En: Biología de la reproducción bovina. Ed. Científico- técnica. La Habana. P 332
- Hostetler, C.E.; Kincaid, R.L. y Mirando, M.A. (2003): The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *Vet J* 166: 125-139.

- Howard, W. T.; Hutjens, F. J.; Reneau, J.; Hartwig, N., (2001). Manejo Lechero: Clínica Reproductiva. Disponible en URL: <http://www.sic.gob.hn/portal/agro/infoagro/Ganado%20lechero/Manejo%20lecherocl%C3%ADnica%20reproductiva.doc> [accedido 18/01/06].
- Howard, W.T. (1997). Manejo lechero. Clínica Reproductiva. Lecturas seleccionadas de reproducción animal: 77-83.
- Huang, Y. D. Y Liu, Z. P. (2001). Poisoning and Metabolism Disease. Science and Technology Press, Lanzhou: 218–219.
- Igarza, L.; Agostini, M.; Becú Villalobos, D. Auza, N. (1996). Effects of molibdenosis on luteinizing-hormone, follicle-stimulating and estradiol hormones in rats. *Arch Med Vet* 28: 101-106.
- Iglesias, JM. (2004). Crianza de hembras de reemplazo del genotipo 5/8H x 3/8C en un sistema silvopastoril. Memorias del II simposio internacional de ganadería agrorecológica, Pag 149-150. Las Tunas, Cuba, Noviembre del 2004.
- ISO- 707. (1997). Leche productos lácteos, procedimientos para la toma de muestras.
- Izaguirre, Ofelia. Y Shimada, A. (2001). Causas del color amarillo de la grasa de bovinos finalizados a pastoreos. *Vet Méx.* 32: 63:71
- Jackson, M.L. (1970). Análisis Químico de Suelos. Univ. de Wisconsin: 662
- Jones, D. G. y Suttle, N. F. (1981). Some effects of copper deficiency on leucocyte unction in sheep and cattle. *Res. Vet. Sci.* 31:151.
- Ji-Pan, Y. y Loo, G. (2000). Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-Lymphocytes. *Free. Rad. Biol,* 28: 824-830.
- Jubb, K.V.F. y Kennedy, P.C. (2007). Pathology of Domestic Animals. Volume Fourth 5Th edition, Academic Press, New York: 398-400.
- Kalmbacher R.S.; Ezenwa, E.V.; Arthington, J.D. y Martin, F.G. (2005). Sulfur fertilization of bahiagrass with varying levels of nitrogen fertilization on a Florida Spodosol. *Agron. J.* 97: 661-667.
- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. (2002). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic Press. 5th ed. San Diego: 117- 137, 327- 349, 441- 480, 621- 648, 885- 905..

- Kehoe, C. A., Faughnan, M. S., Gilmore, W. S., Coulter, J. S., Howard, A. N. & Strain, J. J. (2000) Plasma diamine oxidase activity is greater in copper-adequate than copper-marginal or copper-deficient rats. *J. Nutr.* 130: 30-33.
- Kellogg, D. W.; Socha, M. T.; Tomlinson, D. J. y Jonson, A. B. (2003). Review: Effects of feeding cobalt glucoheptonate and metal specific amino acid complexes of zinc, manganese, and copper on lactation and reproductive performance of dairy cows. *Prof. Anim. Sci.* 19: 1–9.
- Kellogg, D. W.; Tomlinson, D. J.; Socha, M. T. y; Johnson, A. B. (2004). Review: Effects of zinc methionine complex on milk production and somatic cell count of dairy cows: Twelve-trial summary. *Prof. Anim. Sci.* 20: 295–301.
- Kendall, N.R.; Illingworth, D.V. y Telfer, S.B. (2001) Copper responsive infertility in British cattle: the use of a blood caeruloplasmin to copper ratio in determining a requirement for copper supplementation. In Fertility in the High-Producing Dairy Cow Occasional Publication Ed. MG Diskin. British Society of Animal Science, Edinburgh. 26 (2): 429–432
- Kendall, N. R.; Marsters, P.; Scaramuzzi, R. J.; y Campbell, B. K. (2003). Expression of lysyl oxidase and effect of copper chloride and ammonium tetrathiomolybdate on bovine ovarian follicle granulosa cells cultured in serum-free media. *Reproduction* 125: 657–665.
- Knowles, S.O.; Grace, N.D.; Lee, J. y West, D.M. (2000). Impact of Cu x Mo interaction on the Cu status of grazing cattle and sheep. In: Trace Element Update. Foundation for Continuing Education of New Zealand Veterinary Association, Palmerston North: 66–81.
- Kochman, K. ; Gajewska, A. ; Kozłowski, H. ; Masiukiewicz, E. y Rzeszotarska, B. (1992). Increased LH and FSH release from the anterior pituitary of ovariectomized rat, in vivo, by copper-, nickel-, and zinc-LHRH complexes. *J. Ing. Biochem.* 48: 41– 46.
- Kochman, K. ; Gajewska, A. ; Kochman, H. ; Kozłowski, H. ; Masiukiewicz, E. y Rzeszotarska, B. (1997). Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Ni^{2+} -GnRH complexes with the rat pituitary receptor. *J. Ing. Biochem.* 65: 277–279.
- Kodama, H.; Sato, E.; Gu, Y.-H.; Shiga, A.; Fujisawa, C. y Kozum, T. (2006). Effect of copper and diethyldithiocarbamate combination therapy on the macular mouse, an animal model of Menkes disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28 (6): 971-978.
- Kozak, A.; Vecerek, V.; Chloupek, P.; Tremlova, B. y Malena, M. (2003): Veterinary meat inspection of pig carcasses in the Czech Republic during the period of 1995–2002. *Veterinarni Medicina*, 48, 207–213.

- Kráâmar, S.; Gajdò, E.K.; Jelínek, P. y Illek, J. (2003). Changes in content of some macro- and microelements in goat's colostrum within the first 72 h after parturition. *Small Ruminant Res* 49: 213-218.
- Lago, E.P.; Costa, A.P.; Pires, A.V.; Susin, L.; Frias, V.P. y Lago, L.A. (2004). Parámetros metabólicos em vacas leiteiras durante o periodo de trasição post-parto. *Braz J Vet*, 11 (1/2): 98-103.
- Landau, S.; Braw-Tal, R.; Kaim, M.; Bor, A. y Bruckental, I. (2000). Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Animal Reproduction Science*; 64 (3-4): 181-197.
- Langlands, J.P.; Bowles, J.E.; Donald, G.E. y Smith, AG. (1998). Trace element nutrition of grazing ruminants. 2. Hepatic copper storage in young and adult sheep and cattle given varying quantities of oxidized copper particles and other copper supplements. *El Periódico australiano de Investigación agropecuaria* 37(2): 189 – 200.
- Laven, R. A.; Livesey, C. T.; Harmon, R. J. y Scaletti, R. W. (2006) Factors affecting the relationship between caeruloplasmin activity and plasma copper concentration in cattle. *Veterinary Record* 159: 250-251.
- Laven, R. A. y Livesey, C. T. (2005). The diagnosis of copper related disease. Part 2: copper responsive disorders. *Cattle Practice* 13: 55-60.
- Laven, R.A. y Livesey, C.T., (2006). An evaluation of the effect of clotting and processing of blood samples on the recovery of copper from bovine blood. *Veterinary Journal* 171: 295–300.
- Lima, R.; Hernández, M. A.; Betancourt, J. A, (2003). Efecto de la Época del año sobre el Comportamiento de algunos Indicadores Reproductivos en Hatos Lecheros. Revista electrónica; REDVET, ISSN 1695-7504. España. Disponible en URL: <http://www.comunidad.veterinaria.org/articulos.articulo.cfm?articulo=32017&pag=1&area=1&buscar=1&donde=1> <http://www.revistas/redvet/n020203.html>. [accedido el 18/7/06].
- Lima, R.; Hernández, M.A.; Rodríguez, J. L.; Betancourt, J.A. y Artiles, E. (2007). Comportamiento reproductivo y su repercusión económica sobre un rebaño lechero en un sistema de bajos insumos durante el período 1999 – 2006. II encuentro sobre reproducción animal. Memorias del VI Congreso internacional de ciencias veterinarias, La Habana, 10-13 de Abril de 2007. CD-ROM. ISBN 978-959-282-047-3.
- Lippard, S.J. (1999) Free copper ions in the cell?. *Science* 284, 748–749.

- Loeb, F.W y Quimby, W.F. (1999). The clinical chemistry of laboratory animals. 2nd ed. Philadelphia: Taylor & Francis: 231-238.
- López-Alonso, M.; Benedito, J.L.; Miranda, M.; Castillo, C.; Hernández, J. y Shore, R.F. (2002). Cattle as biomonitors of soil arsenic, copper and zinc concentrations in Galicia (NW Spain). *Arch Environ Contam Toxicol* 43: 103– 108.
- López-Alonso, M.; Prieto, F.; Miranda, M.; Castillo, C.; Hernandez, J.R. y Benedito, J.L. (2005). Intracellular distribution of copper and Zinc in the liver copper- exposed cattle from northwest Spain. *Vet J* 170: 332-338.
- López-Gatius, F.; Santolaria, P.; Yániz, J.; Rutlant, J. Y López-Béjar, M. (2001). Persistent ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach. *Theriogenology*; 56 (4): 649-659.
- Loste, A.; Ramos, J.J. y Sáez, T. (2001). Trastornos reproductivos ocasionados por carencias vitamínico-minerales en rumiantes. *Albéitar* 48: 56-58.
- Lucy, M. (2003). The future of dairy reproductive management. [en línea] Disponible en URL: <http://www.afns.ualberta.ca/Hosted/WCDS/Proceedings/2002/Chapter%2013%20Lucy.htm> [accedido 3/10/03].
- Lugton, I.W. (2004). Review of possible links between the clinical expression of paratuberculosis and deficiency of macro and micronutrients. *Australian Veterinary Journal* 34: 275-294.
- Mackenzie, A.M.; Moeini, M.M y Telfer, S.B. (2001). The effect of a copper, cobalt and selenium bolus on fertility and trace element status of dairy cattle. In *Fertility in the High-Producing Dairy Cow Occasional Publication* Ed. MG Diskin. British Society of Animal Science, Edinburgh. 26 (2): 423–427.
- Macmillan, K. L.; Taufá, V.K.; Day, A.M. y Eagles, V.M. (2001). Some effects of postinsemination hormonal therapies on conception rates and reinsemination rates in lactating dairy cows. Proc. In fertility in high producing. Dairy Cows. MG. Diskin. *Brit. Soc. Anim. Sci. Occ*, 25. publ. 26(1): 195-258.
- MacPherson, A. (2000). Forage evaluation in ruminant nutrition (Ed Guivens, G.I; Owens, E.; Axford, R.F and Omed, H.M), CAB international, Wallingford, U.K: 373-378.
- Majak, W.; Steinke, D.; McGillivray, J. y LysyK, T. (2004). Clinical Signs in cattle grazing high Molybdenum forage. *Rangeland Ecology & Management*. 57 (3): 655-663.

- Malhi, H.; Bhargava, K.; Afriyie, M.; Volenberg, Irene.; Schilsky, M.; Palestra, Ch. y Gupta, S. (2002). [99m]Tc-mebrofenin scintigraphy for evaluating liver disease in a rat model of Wilson's disease. *J. nucl. Med.* 43 (2): 246-252.
- Margolles, Estrella.; Colomé, H.; Bell, L.; Labrada, I.; Mayarí, R y Hernández, G. (1987 a). Indicadores Hematoquímicos del Ganado Lechero. *Rev. Cub. Salud Anim* 9: 110-115.
- Margolles, Estrella.; Zaldívar Victoria. Y Labrada, I. (1987 b). Indicadores del funcionamiento hepático en vacas lecheras. *Rev. Cub. Salud Anim* 9: 299-303.
- Margolles, Estrella.; Colomé, H.; Bell, L.; Labrada, I. y Mayarí, R. (1988). Algunos resultados del perfil metabólico en vacas lecheras en Cuba. *Rev. Cub. Salud Anim* 10: 228-235.
- Márquez, Y. C.; Ferraro, S. y López-ortega, A. (2001). Concentración de malondialdehído en cuerpo lúteo bovino. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología. Volumen Especial: 79-85.*
- Martínez, M. A. y Sánchez, C. J. (1999). Alimentación y reproducción en vacas lecheras. Mundo ganadero No. 111, Mayo, 1999. Disponible en URL: <http://www.eumedia.es/articulos/artmganadero.htm> [accedido 18/01/06].
- Mayarí, R y Colomé, H. (1986). Niveles plasmáticos de Zn y Cu en terneros de un Mes de Edad. *Rev. Salud Animal* 8: 13-18.
- Mcbride, M. B y Hale, B. (2004). Molybdenum extractability in soils and uptake by alfalfa 20 years after sewage sludge application. *Soil Science.* 169(7): 505-514.
- McBride, M. B y Cherney, J. (2004). Molybdenum, Sulfur, and Other Trace Elements in Farm Soils and Forages After Sewage Sludge Application. *Taylor & Francis.* 35 (3-4): 517 – 535.
- McBride, M.B. (2005). Molybdenum and Copper Uptake by Forage Grasses and Legumes Grown on a Metal Contaminated Sludge Site. *Taylor & Francis* 36 (17-18): 2489 – 2501.
- McDowell, L.R.; y Valle, G. (2000). Forage evaluation in ruminant nutrition (Ed Guivens, G.I; Owens, E.; Axford, R.F and Omed, H.M), CAB international, Wallingford, U.K: 373-378.
- McDowell, L.R. (2004). Annual California Animal Nutrition conference. Fresno, California, EE.UU: 196-199.
- McDowel, L.R. (2003). Minerals in animal and human nutrition. 2da ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands: 644-650.
- McDowell, L.R.; Davis, P.A.; Cristaldi, L.A.; Wilkinson, N.S.; Buerguelt, C.D y Van Alstyne, R. (2005). Proc. Florida Ruminant Nutrition symposium. Gainesville, Florida, EE.UU : 38-41.

- McDowell, L.R. (2005). *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales*. 2^{da}.Ed. Dep. Zoot. Universidad de la florida. Gainesville. USA. IFAS.
- McDowell, L.R. (2000). *Vitaminas in animal and human nutrition*. 2da ed. Iowa, state University press, Ames, IA: 793- 797.
- McKie, A. T.; Barrow, D.; Latunde-Dada, G. O.; Rolfs, A.; Sager, G.; Mudaly, E.; Mudaly, M.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Raja, K. B.; Shirali, S.; Hediger, M. A.; Farzaneh, F. y Simpson, R. J. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science (Washington, DC)* 291: 1755-1759.
- McLeod, B. (2005). Johne's Disease a nutritional issue. *The Dairyman (New Zealand)*, November, 2005: 20-22.
- Méndez, M. C.; Riet-Correa, F. (2001). Plantas Hepatotóxicas. In: RIET-CORREA, F. et al. (Ed.) *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. São Paulo:Varela, 2, cap. 3: 219-227.
- Mertz, W. y Davis, GK. (1987). Copper. In: Mertz W, editor. *Traceelements in human and animal nutrition*. Vol I. 5th ed.Philadelphia: Academic Press.
- Miles, P. H.; Wilkinson, N. S. y McDowell, L. R. (2001). *Analysis of Minerals for Animal Nutrition Research*. 3rd ed. Dept. Anim. Sci., Univ. Florida, Gainesville.
- Miles, AT.; Hawksworth, G. M.; Beattie, J.H.; Rodilla, V. (2000) Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 35: 35–70.
- Milne, D. B. (1997). Copper intake and assessment of copper status. *Am. J. Clin Nutr.* 67 (8): 1041S–5S.
- Mills CF. (1983). Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. Lon-don (Inglaterra): 1-10.
- MINAG. (2005). *Caracterización de la ganadería vacuna*. Informe del Viceministerio de Ganadería. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana.
- Minatel, L.; Buffarini, M. A.; Carfagnini, J. C. y Homse, A. (1997). Valores de cobre en plasma, hígado y pelo de bovinos de la zona noroeste de la provincia de Buenos aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 17(1): 313-314.

- Minatel, L.; Buffarini, M. A.; Dallorso, M. E.; Homse, A. y Carfagnini, J. C. (1998). Relevamiento mineral de la región noroeste de la provincia de Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18 (1): 67-75.
- Miranda, M.; López-Alonso, M.; Castillo, C.; Hernández, J.; Benedito, J.L. (2000). Effect of sex on arsenic, cadmium, lead, copper and zinc accumulation in calves. *Vet Hum Toxicol.* 42: 265–8.
- Miranda, M.; López-Alonso, M.; Castillo, C.; Hernández, J.; Benedito, J.L. (2005). Effects of moderate pollution on toxic and trace metal levels in calves from a polluted area of northern Spain. *Environment International* 31 : 543– 548.
- Miyajima, H.; Kohno, S.; Takahashi, Y.; Sugimoto, M. (2002). Increased lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in aceruloplasminemia brains. *Blood cells, Molecules, and Diseases* 29: 433-438.
- Miyoshi, S.; Pate, J.L. y Palmquist, D.L. (2001). Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Animal Reproduction Science.* 68 (1-2): 29-43.
- Morales, E.; Domínguez, I.; González-Ronquillo, M.; Jaramillo, G.; Castelán, O.; Pescador, N. y Huerta, M. (2007). Diagnóstico mineral en forraje y suero sanguíneo de bovinos lecheros en dos épocas en el valle central de México. *Tec Pecu Méx*, 45(3): 329-344.
- Mubbasher, S.; Waheed, S. y Hayat, I. (2003). Effect of environmental pollution on quality of meat in district Bagh, Azad Kashmir. *Pakistan Journal of Nutrition.* 2 (2): 98-101.
- Muehlenbein, E. L.; Brink, D, R.; Deutscher, G.H.; Carlson, M.P y Johnson, A. B. (2001). Effects of inorganic and organic copper supplemented to first-calf cows on cow reproduction and calf health and performance. *J. Anim. Sci.* 79: 1650–1659.
- Mufarrege, D.J; Fere, G. S. y Homse, A. (1985). Nutrición mineral en el ganado en la jurisdicción de la EEA Mercedes (Corrientes). *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4(3): 5-7.
- Müller, G. (2001). Fasciolose. In: RIET-CORREA, F. et al. (Ed.) Doenças de Ruminantes e Eqüinos. São Paulo: Varela, vol. 2, cap. 1: 118-130.
- Mullis, L. A.; Spears, J. W. y McCraw, R. L. (2003). Estimated copper requirements of Angus and Simmental heifers. *J. Anim. Sci.* 81: 865-873.
- Muntean N.R.; Laslo, R.; Ghitulescu, R y Muntean, R. (2004). Heavy metal's content in some food products. Institute of Public Health Cluj Napoca, Romania. University of Agricultural Sciences

- and Veterinary Medicine Cluj Napoca, Romania. Disponible en URL: <http://www.date.hu/kiadvany/tessedik/3/muntea1.pdf> [accedido 17/04/07].
- Ndebele, N.; Mtimuni, J. P.; Mpofu, I. D.; Makuza, S. y Mumba, P. (2005). The Status of Selected Minerals in Soil, Forage and Beef Cattle Tissues in a Semi-arid Region of Zimbabwe. *Tropical Animal Health and Production*. 37 (5): 381-393.
- Nocek, J. E.; Johnson, A. B. y Socha, M. T. (2000). Digital characteristics in commercial dairy herds fed metal-specific amino acid complexes. *J. Dairy Sci.* 83: 1553–1572.
- Nocek, J.E.; Socha, M.T y Tomlinson, D.J. (2006). The effect of trace mineral fortification level and source on performance of dairy cattle . *J Dairy Sci.* 89 (7): 2679-93.
- Nockels, C. F.; DeBonis, J. y Torrent, J. (1993). Stress induction affects copper and zinc balance in calves fed organic and inorganic copper and zinc sources. *J. Anim. Sci.* 71: 2539–2545.
- Noval, E. (2000). Importancia de la integración del árbol en la fertilidad de los suelos pecuarios... Tesis presentada en opción al título de Master en Agricultura sostenible. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba: 41-42.
- NRAG 559/1982. Alimentos de consumo animal. Muestreo.
- NRAG 878/1987. Suelos. Análisis químico. Determinación de los índices de grados de acidez.
- NRAG 894/1988. Suelos. Análisis químico. Determinación de Cu, Zn, Fe y Mn.
- National Research Council. (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. (7th Rev. Ed.). Natl. Acad. Sci., Washington, D.C.
- O'Connor, G.A.; Brobst, R.B.; Chaney, R.L.; Kincaid, R.L.; McDowell, L.R.; Pierzynski, G.M.; Rubin, A. y Van Riper, G.G. (2001). A modified risk assessment to establish molybdenum standards for land application of biosolids. *J. Environ. Qual.* 30: 1490–1507.
- Odle, W. (2000). Effect of dietary copper source and concentration on carcass characteristics and lipid and cholesterol metabolism in growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78:1053–1059.
- OPS (1991). Organización panamericana de la salud. Manual para el cálculo de muestreos.
- Oniani, O.G. 1964. Determinación del fósforo y potasio del suelo en una misma solución de los suelos Krasnozen y Podsólicos en Georgia. *Agrojima* 6:25.
- Pandit, A.N y Bhave, S.A. (2002). Copper metabolic defects and liver disease: Environmental aspects. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17: 403–407.
- Paneque, V. 1965. Manual de Prácticas de Suelos. Universidad de la Habana.
- Parker, R. (1989). Body condition scoring of Dairy Casttle. Factsheet AGNES. 410: 420.

- Parnell Laboratorios NZ Ltd. (2001). Copperex Injection. Index of Veterinary Specialties. Annual, Auckland.
- Pavlata, L.; Illek, J. y Pechová, A. (2001). Blood and tissue selenium concentrations in calves treated with inorganic or organic selenium compounds – a comparison. *Acta Vet Brno* 70: 19-26.
- Pavlata, L.; Pechová, A.; Illek, J. (2000). Direct and indirect assessment of selenium status in cattle – a comparison. *Acta Vet Brno* 69: 281-287.
- Pavlata L.; Pechova, A. y Dvorak, R. (2004). Microelements in colostrum and blood of cows and their calves during colostrum nutrition. *Acta Ve. Brno*, 73: 421–429.
- Pavlata, L.; Podhorsk, A.; Pechova, A. y Chomat, P. (2005). Differences in the occurrence of selenium, Copper and zinc deficiencies in dairy cows, calves, heifers and bulls. *Vet. Med. – Czech*, 50 (9): 390–400.
- Pechin, G. H.; Cseh, S.; Corbellini, C.; Idiart, J.; Moralejo, R.; Visconti, M.; Drake, M. y Yarrar, M. (1995). Estudio de las deficiencias minerales en bovinos de carne en el departamento Maracó, provincia de La Pampa, Argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim*, 15(2): 492-494.
- Pechín, G. H.; Idiart, J. L.; Cseh, S.; Corbellini, C. N.; Moralejo, R. H. (1998). Evaluación de dos vías de administración de cobre (oral y parenteral) en bovinos de carne. *Rev. Prod. Anim.* 18(1): 317-318.
- Pechín, G. H.; Idiart, J. L.; Cseh, S.; Corbellini, C. N.; Moralejo, R. H.; Cesán, R.; O. y Sánchez, L. O. (1999). Respuesta a la suplementación con cobre inyectable en distintos rangos de deficiencia en bovinos de carne. *Rev. Arg. Prod. Anim*, 19(2): 347-358.
- Pedroso, R.; Lavandeira, L. y González, Noelia. (1984). Estado metabólico de hembras bovinas en rebaños con problemas reproductivos. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 2: 71-83.
- Pedroso, R.; Lavandeira, L.; González, Noelia. y Ruviera, E.G. (1985). Estado Mineral de Vacas Santa Gertrudis en La Isla de Turiguanó. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 2: 45-54.
- Pedroso, R.; Lagos, P.; Roler, Felicia. y Macola, A. (1987). Estado Metabólico Actual de Vacas Altas Productoras Destinadas al Trasplante de Embriones. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 13 (2): 79-89.
- Pedroso, R.; González, Noelia y Tarrero, R. (1991). Reproductive performance and metabolic status of cross breed heifers (HxC) fed with sugar cane by-products and confined in corrals. Final Research coordination Meeting. Research Program FAO -OIEA. Piracicaba, 23 oct - 6

Nov, Brasil.

- Pedroso, R.; Tarrero, R.; González, Noelia.; Crespo, S.; García, J.G.; Felipe, N. y Pérez, R. (1996). Reproductive performance and metabolic status of crossbreed heifers fed sugarcane by-products. Proc. Final Research Coordination Meeting. FAO/ IAEA-TECDOC-877, 1996.
- Pedroso, R.; Roller, Felicia.; Felipe, N.; Portales, A. y Bravo, M. (2000). Métodos biotécnicos para mejorar la fertilidad del ganado en clima subtropical. En Proc. I. Congreso Internacional para el Mejoramiento Animal. La Habana: 1-9.
- Pedroso, R. y Roller, Felicia (1997). Alteraciones metabólicas y carenciales que afectan la reproducción y el desarrollo de la aplicación de las tecnologías de transferencia de embriones y fertilización in vitro. Folleto. CIMA. MINAGRI. C. Habana. 1997.
- Pedroso, R y Felicia Roller. (2004). Efecto de la Condición Corporal sobre la fertilidad de las vacas mestizas Holstein x Cebú en clima tropical. *Rev. Cub. Reprod. anim.* 30 (1y2): 31 – 37.
- Pedroso, R. (2002). Conferencia sobre reproducción de la hembra bovina. XVIII PANVET. Noviembre del Palacio de Las Convenciones. La Habana, Cuba.
- Pedroso, R.; Roller, Felicia. y López, L. (2003). Relación entre la condición corporal, estado metabólico y la fertilidad de la hembra bovina. *Rev. Cub. Reprod. Anim.*, 29 (1): 231-235.
- Pedroso, R. (2003). Métodos biotécnicos para mejorar la fertilidad del ganado bovino en los programas de inseminación artificial e inducción y sincronización del celo. Tesis, para la Opción al grado Científico de Dr.Cs. Universidad Agraria de la Habana. La Habana.
- Pedroso, R. (2004). Control reproductivo mediante terapéutica hormonal. En Reunión anual de Reproducción Animal (GAIPA). Empresa Pecuaria En V. Congreso. Venegas. Provincia de Sancti Spiritus.
- Pedroso, R. (2005). Interacción entre nutrición y reproducción en la hembra bovina. Conferencia. Instituto de Ganadería Tropical. Ministerio de la Agricultura. La Habana.
- Perea, J.; Verna, A.; Morsella, C.; Cseh, S. y Paolicchi, F. (2002). Relación entre los microelementos Cobre, Zinc, Hierro, Selenio, Molibdeno y la paratuberculosis en ganado bovino. XIVa. Reunión Anual de la AAVLD (Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico) 13 al 15 de noviembre de 2002, Villa Gral. Belgrano, Sierras de Córdoba.

- Pérez, E. (2004). Efecto del consumo de gallinaza sobre la química sanguínea y alteraciones hepáticas en ovinos. Trabajo de Grado Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela: 51-55.
- Phillippo, M.; Humphries, W.R.; Atkinson, T.; Henderson, G.D. y Garthwaite, PH. (1987). The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrus cycles in cattle. *J Agric Sci* 109: 321-336.
- Picco, S.; Mattioli, G.; De Luca, J C.; Fazzio, L E.; Romero, J.R. y Dulout, F. N. (2002). Avances en el Estudio de Indicadores de la Hipocuprosis Bovina. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia. de Buenos Aires.* 24: 36-39.
- Picco, S.J.; Abba1, M.C.;Mattioli, G.A.; Fazzio, L.E.; D.Rosa2, J.; De Luca1, C. y Dulout1, F.N. (2004). Association between copper deficiency and DNA damage in cattle. *Mutagenesis.* 19 (6): 453—456.
- Quintela, L.A.; Díaz, C.; Peña, A.I.; Becerra, J.J. y Herradón, P.G.(1997). Importancia de los minerales y las vitaminas en la reproducción del ganado vacuno. *Albéitar* 9: 12-14.
- Quiroga, M.; Igarza, L. Landa, R.; Ruiz Moreno, M.; Perotti R.y Silva, E.. (1995). Evaluación del tratamiento con glicinato de cobre en bovinos con deficiencia de cobre. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15(3-4): 806-808.
- Quiroz, R. G. F.; Bouda, J.; Núñez, O. L.; Sosa F, C y Castillo, Delia A. (2003). Utilización de la ceruloplasmina, cobre sérico y hepático para el diagnóstico de deficiencias de cobre en vacas. *Vet. Méx.,* 34 (2): 146-153
- Quiroz-Rocha GF y Bouda, J. (2000). Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. *Vet Méx* 32: 289-296.
- Rabiansky, P. A.; McDowell, L. R.; Velasquez-Pereira, J.; Wilkinson, N. S.; Percival, S. S.; Martin, F. G.; Bates, D. B.; Johnson, A. B.; Batra, T. R. y Salgado-Madriz, E. (1999). Evaluating copper lysine and copper sulfate sources for heifers. *J. Dairy Sci.* 82: 2642–2650.
- Rabotnikof, C. M.; Gonella, C. A.; Stritzler N. P.; y Floris, N. R.; (1983). Efecto de la suplementación parenteral de cobre sobre los niveles de cobre en sangre y la ganancia de peso en novillos en el área de General Villegas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 3 (5): 446-457.
- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C. y Hinchcliff, K.W. (2000). *Veterinary medicine. a text book of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses;* 9th edition. ISBN 0 7020 2604 2. W. B. Saunders company ltd. Londres.

- Radostits, O.M.; Blood, D.C. y Gay, C.C. (1994). *Veterinary medicine*. 8th ed. London (UK): Baillière Tindall.
- Ramírez, C.E.; Tittarelli, C.M.; Mattioli, G.A.; Giuliadori, M.J. y Puchuri, M.C. (1997). Hipocupremia bovina en 5 partidos de la provincia de Buenos Aires. Argentina. *Vet Arg* 14 (131): 12-17.
- Ramírez, J.; González, P.J.; Vieito, E.L.; Clavel, N.; Arbola, B. y Cerero, B. (2002). Efecto de la fertilización orgánica en la producción de semillas de *Andropogon Gayanus* Cv. IAT-621 y *Pueraria Phaseoloides* CV CIAT-9900. *Pastos y Forrajes*. 25: 81-87.
- Randhawa C.S. y Randhawa S.S. (2002): Copper status of crossbred cows of the organised and rural dairy herds in central Punjab. *Indian. J Anim.Sci.* 72: 1087–1091.
- Reeves, P. G.; DeMars, L. C.; Johnson, W. T. y Lukaski, H. C. (2005). Dietary Copper Deficiency Reduces Iron Absorption and Duodenal Enterocyte Hephaestin Protein in Male and Female Rats. *J. Nutr* 135(1): 92 – 98.
- Reeves, P. G. y DeMars, L.C. (2005). Repletion of Copper-Deficient Rats with Dietary Copper Restores Duodenal Hephaestin Protein and Iron Absorption. *Experimental Biology and Medicine*. 230(5): 320 – 325.
- Reinoso, M. (2000). Condición corporal y desempeño productivo y reproductivo de vacas Siboney de Cuba en un contexto silvopastoril. *Pastos y forrajes*. 20: 23-47.
- Reinoso, M. y Pino, M. (2003). Estudio de algunos indicadores del comportamiento reproductivo de bovinos de leche manejados en condiciones de pastoreo racional con y sin alborización. *Rev. Med. Vet.* 3: 38-43.
- Reinoso, M.; Diaz, F. y Simón, L. (2005). Pastizales alborizados. Beneficios nutricionales en comparación con monoculturas. *Revista cubana de ciencia agricola*. 39 (2): 165-173.
- Rentzsch, A.; Krummeck-Weiss, G.; Hofer, A.; Bartuschka, A.; Ostermann, K. y Rodel, G. (1999) Mitochondrial copper metabolism in yeast: mutational analysis of SCO1p involved in the biogenesis of cytochrome *c* oxidase. *Curr. Genet.* 35: 103–108.
- Rhue, R D y Kidder, G. (1983) Analytical procedures used by the IFAS Extension Soil Testing Laboratory and the interpretation of results. Soil Science Department, University of Florida, Gainesville.
- Ricciardino, M. Z.; Scena, C. G. y Piccinali, R. L. (1997). Minerales (P, Zn, Cu) y proteínas plasmáticas en vacas primíparas con cría al pie. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 17 (1): 306- 310.

- Ricciardino, M.Z.; Zulema, A. y Piccinali, R.L. (1998). Efectos de la suplementación parenteral con minerales (Cu, Se, P) y vitaminas (E y D), sobre parámetros productivos en Vaquillas sobre pasturas naturales. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18 (1): 335-341.
- Robles, C. A.; Uzal, F. A. y Olaechea, F. V. (1993). Intoxicación crónica por cobre en ovinos lecheros. *Vet. Arg.* 10 (92): 95-97.
- Rodríguez, I. (2000). Influencias de las excreciones de vacas lecheras en el reciclaje de los macronutrientes en el agroecosistema de pastizal. Tesis presentada en opción al grado de doctor en ciencias agrícolas. Instituto de ciencia animal. La Habana, Cuba: 31.
- Rodríguez, H.; Sánchez, E.; Rodríguez, M.; Vidales, J.A.; Acuña, K.; Martínez, G. y Rodríguez, J:C: (2005). Metales pesados en leche cruda de bovino. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN)*, 6 (4). Disponible en URL: <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn>. ISSN 1870-0160. [accedido 15/04/07].
- Rodríguez, Idalmis.; Crespo, G.; Torres, Verena.; Calero, B.; Morales, Amalia.; Otero, Lázara.; Hernández, L.; Fraga, S. y Santillán, Bertha. (2006). Evaluación integral del complejo suelo-planta-animal en una unidad lechera con silvopastoreo en la provincia la habana, cuba. IV Congreso Latinoamericano de agroforestería para la producción pecuaria sostenible, Varadero Cuba.
- Rojas, E. (2006). Clasificaciones del comportamiento de los costos. Costo de oportunidad. Disponible en URL: http://www.wikilearning.com/monografia/clasificaciones_del_comportamiento_de_los_costos-costo_de_oportunidad/12965-6. [accedido 18/2/2008].
- Rojas, L.X.; McDowell, L.R; Martin, F.G y Wilkinson, N.S. (1993). Estado mineral de suelos, pastos y ganado de carne en el sureste de Venezuela síndrome parapléjico: una revisión. *Zootecnia Tropical*, 11(1): 27-47.
- Rombach, E. P.; Barboza, P.R. y Blake, J.E. (2003). Costs of gestation in an Arctic ruminant: copper reserves in. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 134: 157–168.
- Romero, JR. (2003) Causas de mortandad y abortos en bovinos. *Revista de medicina Veterinaria*. Enviado para su publicación. Disponible en URL: <http://www.racve.es/actividades/ciencias-basicas/htm>. [accedido 18/03/06].
- Rosa, D. E.; Mattioli, G. A., (2002). Metabolismo y deficiencia de cobre en los bovinos. *Rev Analecta Veterinaria*, 22 (1):7 – 16. Disponible en URL:

http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol22n1/051_VE22n1_rosa_metabolismo_cobre.pdf

[accedido el 1/06/06].

- Royal, M.D.; Darwash, A.O.; Flint, A.P.E.; Webb, R.; Woolliams, J.A. y Lamming, G.E. (2000) Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility *Anim.Sci.*70: 487–501.
- Rucker, RB.; Kosonen, T.; Clegg, M.S.; Mitchell, A.E.; Rucker, B.R.; Urie-Hare, J.Y. y Keen, CL (1998) Copper, lysyl oxidase and extracellular matrix protein cross-linking *American Journal of Clinical Nutrition* 67: 996–1002.
- Ruiz, Teresita, González, Noelia y Pedroso, R. (1995).Deficiencias minerales en el ganado bovino en Cuba. IX. Forum de Ciencia y Técnica. CIMA. C. Habana: 16-17.
- Saari, J. T. (2002) Renal copper as an index of copper status in marginal deficiency. *Biol. Trace Elem. Res.* 86: 237-247.
- Salih, Y. M.; McDowell, L.R.; Hentges, J. F.; Mason, R. M. y Conrad, J. H. (2005). Mineral status of grazing beef cattle in the warm climate region of Florida Springer Netherlands, ISSN 0049-4747: 245-251..
- Sánchez, A.; Cruz, María A.; García, D y Pino, D. (2004). Observaciones clínico patológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. *RC*, 14 (4): 317-323.
- Scaletti, R.W.; Trammell, D.S.; Smith, B.A. y Harmon, R.J (2003). Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 86: 1240-1249.
- Schefer, J.F. (2003). Enzimología clínica em medicina Veterinaria. Monografía de graduãcao. Universidade federal do Rio Grande do Sur: 23- 34.
- Sharma, M.C.; Raju, S.; Joshi, C.; Kaur, H., Varshney, V.P.; (2003). Studies on serum micromineral, hormone and vitamin pro.le and its e.ect on production and therapeutic management of bu.aloes in Haryana state of India. *Asian Australasian J Anim. Sci.* 16 (4): 519–528.
- Sharma, M.C.; Joshi, C.; Pathak, N.N. y Kaur, H. (2005). Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. *Research in Veterinary Science* 79: 113–123.
- Shaw, D. y Ihle, S. (1999). Medicina de Pequenos Animais. Porto Alegre: ArtMed: 696- 704.
- Slavik, P.; Illek, J. y Zeleny, T. (2006). Zinc and Copper status of beef cattle in the Sumava, Czech Republic. *Acta Vet. Vrno* 75: 485- 488.

- Slee, R.B.; Hillier, S.G.; Largue, P.; Harlow, C.R.; Miele, G. y Clinton, M. (2001). Differentiation-dependant expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells *Endocrinology* 142: 1082–1089.
- Smart, M.E.; Cohen, R.; Christensen, D.A. y Williams, C.M. (1986). The effects of sulphates removal from the drinking wa-ter on the plasma and liver copper and zinc concentra-tion of beef cows and their calves. *Can J Anim Sci* 66: 669-680.
- Smith, W.A. (2003). Decrease negative effects of johne’s disease by utilizing injectable trace elements. Disponible en URL: <http://www.multiminglobal.com/aus/ViewDocument.asp?DocID=323>. [accedido 15/10/06].
- Soderman, J.P.; Weaver, G.E. y Larson, LL. (1987). Effect of dietary protein level and exogenous gonadotropin realizing hormone on circulation progesterone concentration in lactating Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 70: 183-189.
- Soler, J. P.; Moore, D. P. y Cseh, S. B., (2006). Empleo del cobre sanguíneo y hepático como indicadores del nivel de cobre en bovinos. Disponible en URL: http://www.cuencarural.com/ganaderia/bovinos/empleo_del_cobre_sanguineo_y_hepatico_como_indicadores_del_nivel_de_cobre_en_bovinos/ [accedido 1/06/06].
- Spears, J. W. (2003). Trace mineral bioavailability y ruminants. *J. Nutr.* 133:1506 – 1509.
- Sprinkle, J.E.; Cuneo, S. P.; Frederick, H. M.; Enns, R. M.; Schafer, D.W. y Carstens, G.E. (2006). Effects of a long-acting, trace mineral, reticulorumen bolus on range cow productivity and trace mineral profiles. *J. Anim. Sci.* 84: 1439-1453.
- Stanton, T. L.; Whittier, J. C.; Geary, T. W.; Kimberling, C. V. y Johnson, A. B. (2000). Effects of trace mineral supplementation on cow-calf performance, reproduction, and immune function. *Prof. Anim. Sci.* 16: 121–127.
- Stanton, T. L., D. Schutz, and C. Swenson. (2001). Trace mineral supplementation in the presence of antagonists on growth performance, health and carcass characteristics of transport-stressed claves. *Prof. Anim. Sci.* 17: 101-110.
- Steffen, J.D.; Carlson, M.P. y Casper, H.H. (1997) Copper toxicosis in suckling beef calves associated whit improper adimnistration of Cooper oxide boluses. *J Vet Diagn Invest* 9: 443-447.

- Stevenson, J.S.; Thompson, K.E.; Fabes, W.L.; Lamb, G.C.; Grieger, D.M. y Corah, L.P. (2000). Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cow after combination of GnRH, Norgestomet, and prostaglandine F2 α with of without timed insemination. *Jl Anim.Sci.* 78: 1747-1758.
- Stoszek, M. J.; Mika, P. G.; Oldfield, J. E. y Weswig, P. H. (1986). Influence of copper supplementation on blood and liver copper in cattle fed tall fescue or quackgrass. *J. Anim. Sci.* 62: 263–271.
- Suárez, M.A.; Pérez, T y Évora, J.C. (2001). Edad y peso a la incorporación en novillas Siboney de Cuba en relación a su comportamiento reproductivo posterior. II Cong Intern Ganadería Doble propósito. La Habana, Cuba. En: XVII Reunión Latinoam. Prod. Animal. *Arch. Latinoam. Prod. Animal.* 9 (1): 25-30.
- Suttle, N.F. (1983). Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra): 19-25.
- Suttle, N.F. (1986). Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet Rec* 119: 148-152.
- Suttle NF. (1991). The interaction between copper, molybdenum, and sulphur in ruminant nutrition. *Annu Rev Nutr* 11: 121-140.
- Suttle, N. F. (2002) Copper deficiency – how has the disease and its diagnosis changed in the last 15 years? *Cattle Practice* 10: 275-278.
- Suzuki, M., and G. Bialy. (1964). Studies on copper-induced ovulation in the rabbit. *Endocrinology* 74: 780–783.
- Swenson, C. K.; Ansotegui, R.P.; Swenson, E.J.; Paterson, J.A. y Johnson, A.B. (1998). Trace mineral supplementation effects on first-calf beef heifer reproduction, milk production and calf performance. In Proc. Western Section Am. Soc. Anim. Sci., Denver, CO. Am. Soc. Anim. Sci., Savoy, IL: 327- 331.
- Swenson, M.J y Reece, W.O. (1993). Duke's physiology of domestic animals. 11th ed. New York: Comstock Publications Assoc.,
- t'Manneteje, L. y Haydock, H.P. (1963). The dry matter weight rank method for the botanical analysis of pasture. *J. Brit, Grassld. Soc.* 18:268.

- Tarrero, R.; Lavandeira, L.; Pedroso, R.; Martínez- Moles, M.; Ruiz, Teresa y Caballero, Orquidea. (1988). Corrección de la Deficiencia de Cobre en rebaños de Vacas Lecheras y su relación con la Reproducción en Condiciones de Producción. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 1: 59-77.
- Telfer, S. B.; Kendall, N. R.; Illingworth, D. V. y Mackenzie, A. M. (2004) Molybdenum toxicity in cattle: an underestimated problem. *Cattle Practice* 12: 259-263.
- Telfer, S. B.; Kendall, N. R.; Illingworth, D. V. y Mackenzie, A. M. (2005). Copper deficiency or molybdenum toxicity? *Cattle Practice* 13: 284-286.
- Tessman, R.K.; Lakritz, J.; Tyler, J.W.; Casteel, S.W.; Williams, J.E; y Dew, R.K. (2001). Sensitivity and specificity of serum copper determination for detection of copper deficiency in feeder calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218: 756--760.
- Thatcher, W. W.; Guzeloglu, A.; Meikler, A.; Kamimura, S.; Bilby, T.; Kowalski, A.A.; Badingan, L. Pershing, R.; Bartolomé, J. y Santos, J.E. (2004). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction Supplement.* 61: 253-266.
- Thomas, C. y Oates, P. S. (2003) Copper deficiency increases iron absorption in the rat. *Am. J. Physiol.* 285: 789-795.
- Thrusfield, M. (1999). *Veterinary Epidemiology.* 2^{da} ed. Blackwell Science Ltd., London: 181-185.
- Tiffany, M.E.; McDowell, L.R.; O'Connor, G.A.; Nguyen, H.; Martin, F.G.; Wilkinson, N.S.; y Cardoso, E.C. (2000). Effects of pasture-applied biosolids on forage and soil concentrations over a grazing season in North Florida. II Microminerals. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 31: 215–227.
- Tittarelli, C.M.; Mattioli, G.A.; Giuliadori, M.J. y Ramirez, C. E. (1997) Asociación de la Hipocuprosis bovina a los excesos de agua en la cuenca del Río Salado. Fac. CS. Veterinarias. UNLP. En ACTAS (1997).
- Tomlinson, D. J., M. T. Socha, and A. B. Johnson. (2001). Summary of eight trials evaluating the effects of feeding a combination of complexed zinc methionine, manganese methionine, copper lysine and cobalt glucoheptonate on lactation and reproductive performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 79(1): 86 (Abs.).
- Uchida, K.; Mandebvu, C., P.; Ballard, C.S.; Sniffen, C. J. y Carter, M. P. (2001)). Effect of feeding a combination of zinc, manganese and copper amino complexes, and cobalt glucoheptonate on performance of early lactation high producing dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 93: 193–203.

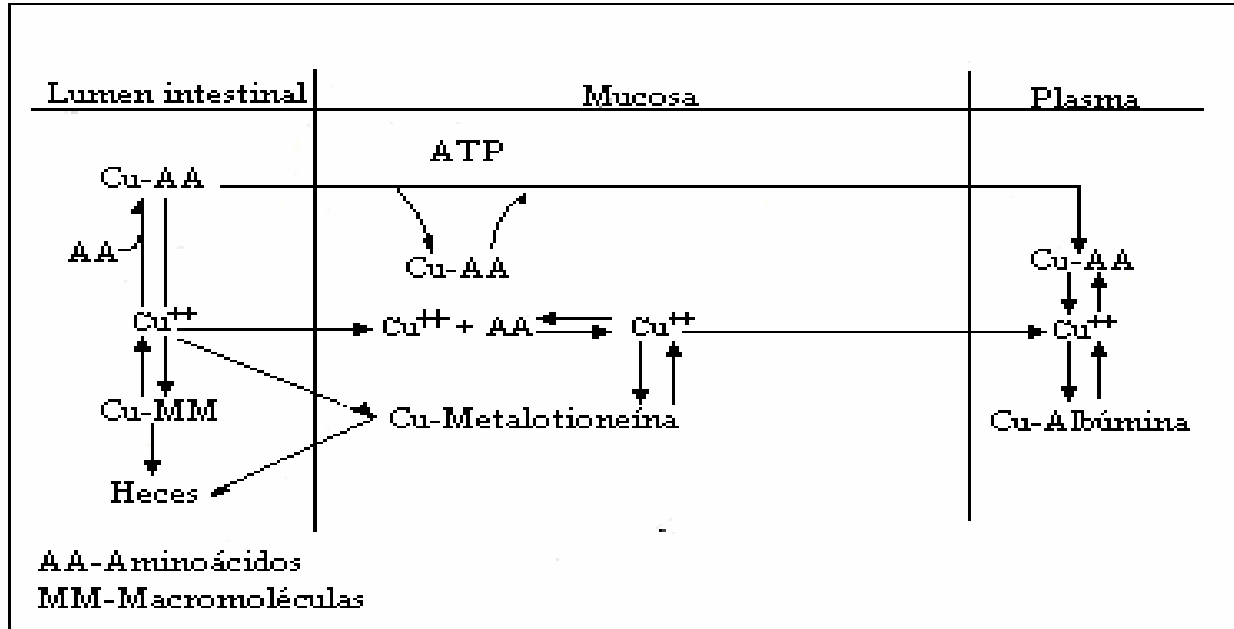
- Underwood, E.J.; Suttle, N.F., (2001). *The Mineral Nutrition of Livestock*, third ed. CABI International, Wallingford, UK: 283–342.
- Uzal, F. A.; Robles, C. A. Garro, J.; Olaechea, F.V.; Arrigo, J.L y Wolf, M. (1992). Intoxicación aguda por cobre en ovinos. *Vet. Arg.* 9 (89): 599-603.
- Van Niekerk, F.E.; Cloete, S.W.; Coetzer, W.A.; Du Plessis, S.S.; Wellington, A.C. y Smith W.A. (1994). An assessment of the toxicity of parenteral treatment with copper EDTA and copper heptonate in sheep. *Journal of the South African Veterinary Association.* 65 (2): 46-51.
- Vanegas, J. A.; Reynolds, J. y Atwill, E. R. (2004). Effects of an Injectable Trace Mineral Supplement on First-Service Conception Rate of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87: 3665-3671.
- Vargas, S.; Cairo, P.; Franco, R.; Oramas, E.; Muñoz, E.; Torres, P.; Jiménez, R.; Rodríguez, Oralia y Abreu, Ines. (2002). Diagnostico de la fertilidad fisico quimica del suelo en un agroecosistema lechero. *Pastos y Forrajes.* 25: 99 – 105.
- Vargas, S.; Cairo, P.; Franco, R.; Gutiérrez, D. I.; Muñoz, E. Y Pereira, C. A. (2003). Evaluación preliminar de algunos indicadores de la fertilidad química del suelo en un agroecosistema ganadero. *Revista cubana de ciencia agricola* 37(1): 83-90.
- Vargas, S. (2008). Rediseño, manejo y evaluación de un agroecosistema de pastizal con enfoque integrado para la producción de leche bovina. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias veterinarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba: 62-64.
- Vazquez, Ondina. (1992). Contribución al estudio de la deficiencia de cobre en el Ganado bovino en pastoreo en condiciones de producción. Tesis presentada en opción al título de especialista en Bioquímica-Bromatología- Toxicología. ICA, UNAH, 1992.
- Vermunt, J.J. y West, D.M. (1994). Predicting copper status in beefcattle using serum copper concentrations. *NZ Vet J* 42: 142-143.
- Viejo, R. E. y Casaro, A. P. (1993). Efectos de la suplementación con cobre sobre la ganancia de peso, cobre hepático y plasmático en terneros. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 13 (2):97-105.
- Villa, N.; Ceballos, A.; Ceron, D. y Serna. C.A. (1999). Clinical biochemistry values in serum from grazing brahman cows. *Pesq. agropec. Bras,* 34 (12): 2339-2343.
- Visentini, G. (2000) Evaluación del desempeño reproductivo de rodeos lecheros en Argentina. Conferencia UNAH.

- Vivas L. (2002). Evaluación de la ganancia diaria de peso y de posibles alteraciones en el tracto digestivo de ovinos alimentados con cama de pollos Trabajo de Grado Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela: 51.
- Walter, O y Marro, O (2003). Efecto de la administración de cobre y selenio inyectable sobre el comportamiento reproductivo de la vacas lecheras Disponible en URL: <http://www.inta.gov.ar/manfredi/info>. [accedido 18/05/06].
- Ward, J.D. y Spears, J.W. (1995). Gengelbach GP. Differences in copper status and copper metabolism among Angus, Simmental and Charolais cattle. *J Anim Sci* 73: 571-577.
- Ward, J.D.; Spears, J.W. y Kegley, E.B. (1996). Bioavailability of copper proteinate and copper carbonate relative to copper sulfate in cattle. *J Dairy Sci* 79: 127-132.
- Wattiaux, M.A. (1996). Manejo de la eficiencia Reproductiva en: El Instituto Babcock para Investigación y Desarrollo Internacional para la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison, Wisconsin. Resumen No. 6: 1-4.
- Webb, C.; Twedt, D. y Meyer, D. (2002). Copper-associated liver disease in Dalmatians: A review of 10 dogs (1998-2001) *J. vet. intern. med.* 16, (6): 665-668.
- West, E. C. y Prohaska, J. R. (2004). Cu,Zn-Superoxide Dismutase Is Lower and Copper Chaperone CCS Is Higher in Erythrocytes of Copper-Deficient Rats and Mice. *Experimental Biology and Medicine*. 229 (8): 756 – 764.
- Weston, F. G. (1994). Análisis de los estados financieros. Fundamentos de administración financiera. Universidad de La Habana, Facultad de Economía. Ed. EMPSES, La Habana, 1994.
- Wilson, P.R. y Grace, N.D. (2002). Practical considerations for diagnosis and management of copper status of deer. *Proceedings of the New Zealand Society for Animal Production* 62: 315–318.
- Wittenberg, K. M.; Boila, R. J. y Shariff, M. A. (1990). Comparison of copper sulfate and copper proteinate as copper sources for copper-depleted steers fed high molybdenum diets. *Can. J. Anim. Sci.* 70: 895–904.
- Wright, C. L.; Spears, J. W.; Brown, T. T.; Lloyd, K.; E. y Tiffany. M. E. (2000). Effects of chromium and copper on performance and immune function of stressed steers. *J. Anim. Sci.* 78: (1): 1-7.
- Xin, Z.; Silvia, W. J.; Waterman, D. F.; Hemken, R.W.; y Tucker. W. B. (1993). Effect of copper status on luteinizing hormone secretion in dairy steers. *J. Dairy Sci.* 76: 437–444.

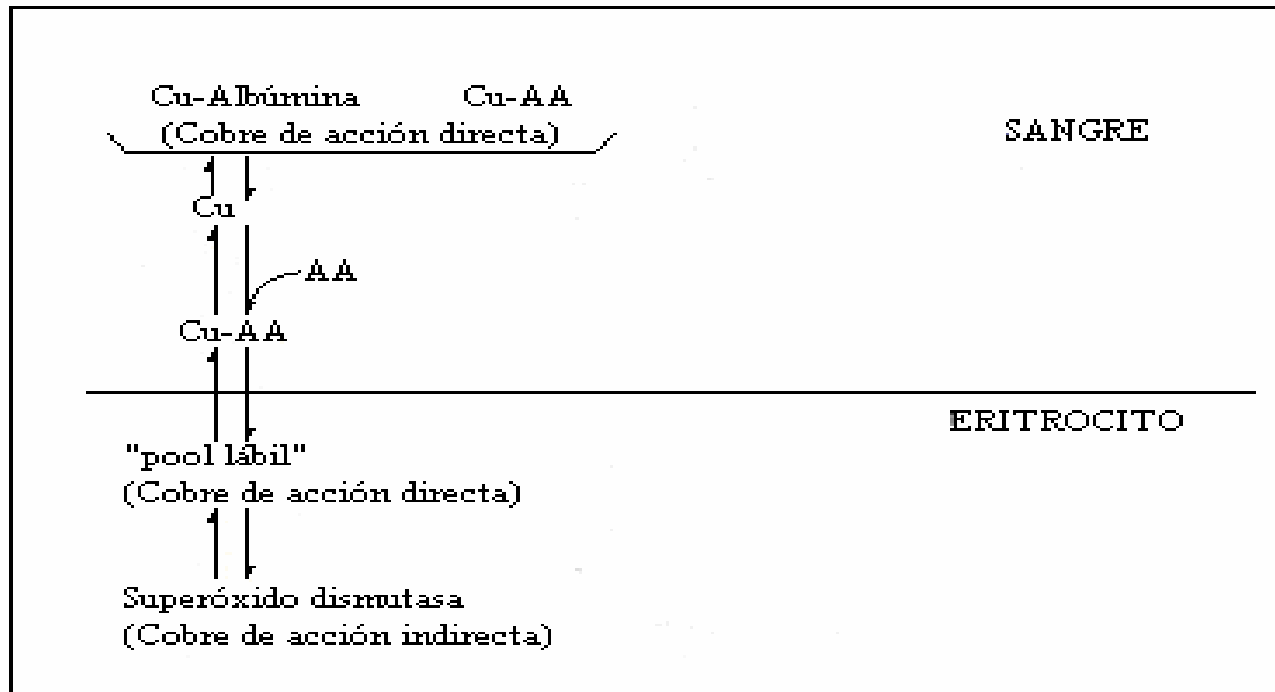
- Yost, G.P.; Arthington, J.D.; McDowell, L.R.; Martin, F.G.; Wilkinson, N.S.; and Swenson, C.K. (2002). Effect of Copper Source and Level on the Rate and Extent of Copper Repletion in Holstein Heifers. *J. Dairy Sci.* 85: 3297-3303.
- Zaldívar, Victoria.; Margolles, Estrella.; Álvarez, J.L. y Valdés, Elena. (1989). Valores de actividad sérica de ASAT, GLGH y F. alc. En bovinos Holstein. *Rev. Salud anim.* 11: 218-222.

Anexos

Anexo1: Absorción intestinal del Cobre (Dezcalzo, 2003).



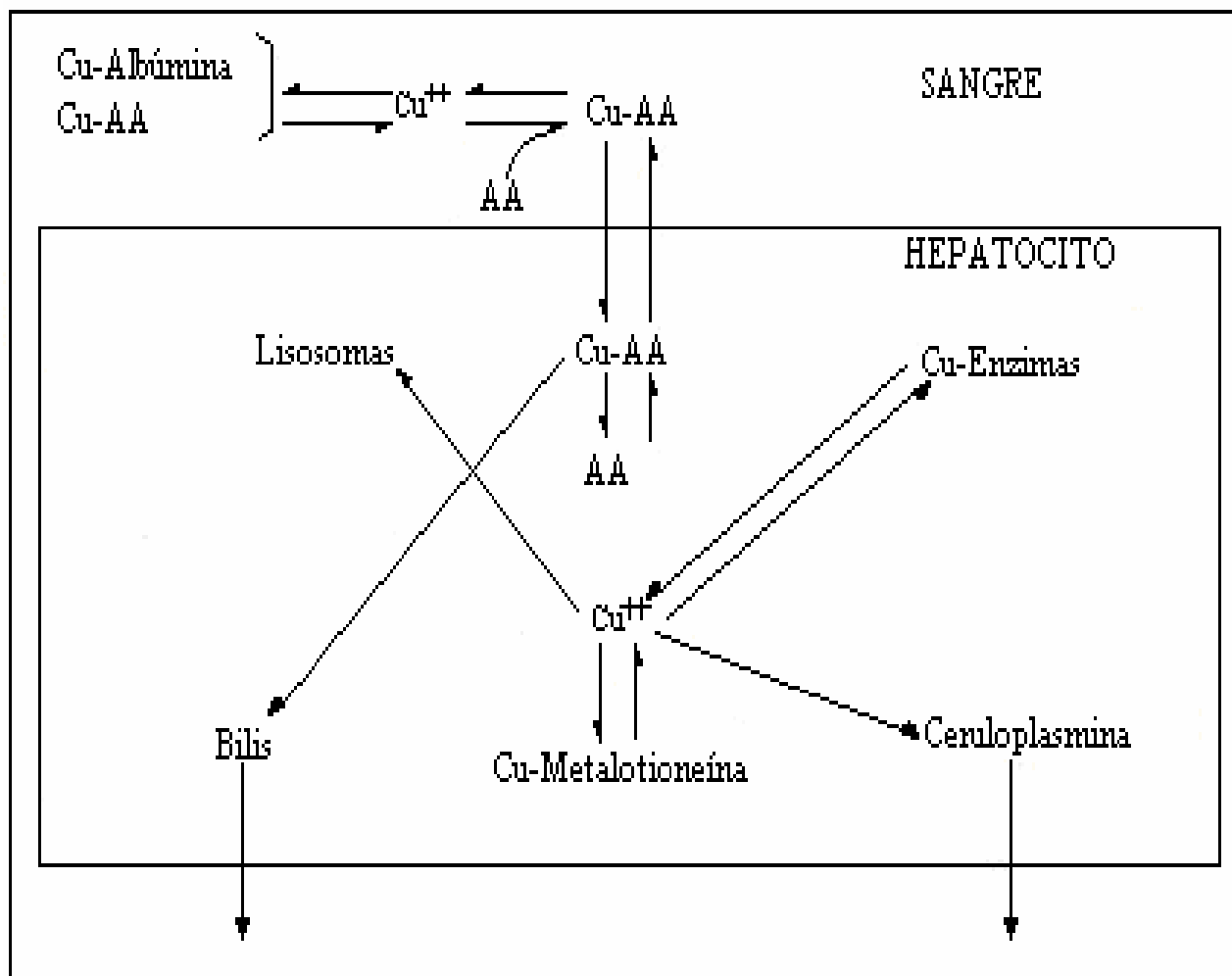
Anexo 2: Equilibrio existente entre el Cu plasmático y el eritrocitario (Dezcalzo, 2003).



Anexo 3: Concentración de Cu (ppm) en Distintos órganos Bovinos (Dezcalzo, 2003).

Órgano	Hígado	Corazón	Riñón	Pulmones	Bazo	Páncreas
Adulto	77	15.6	19.7	5.3	2.9	3.8
Recién nacido	470	14.8	15.7	4.9	4.8	8.5

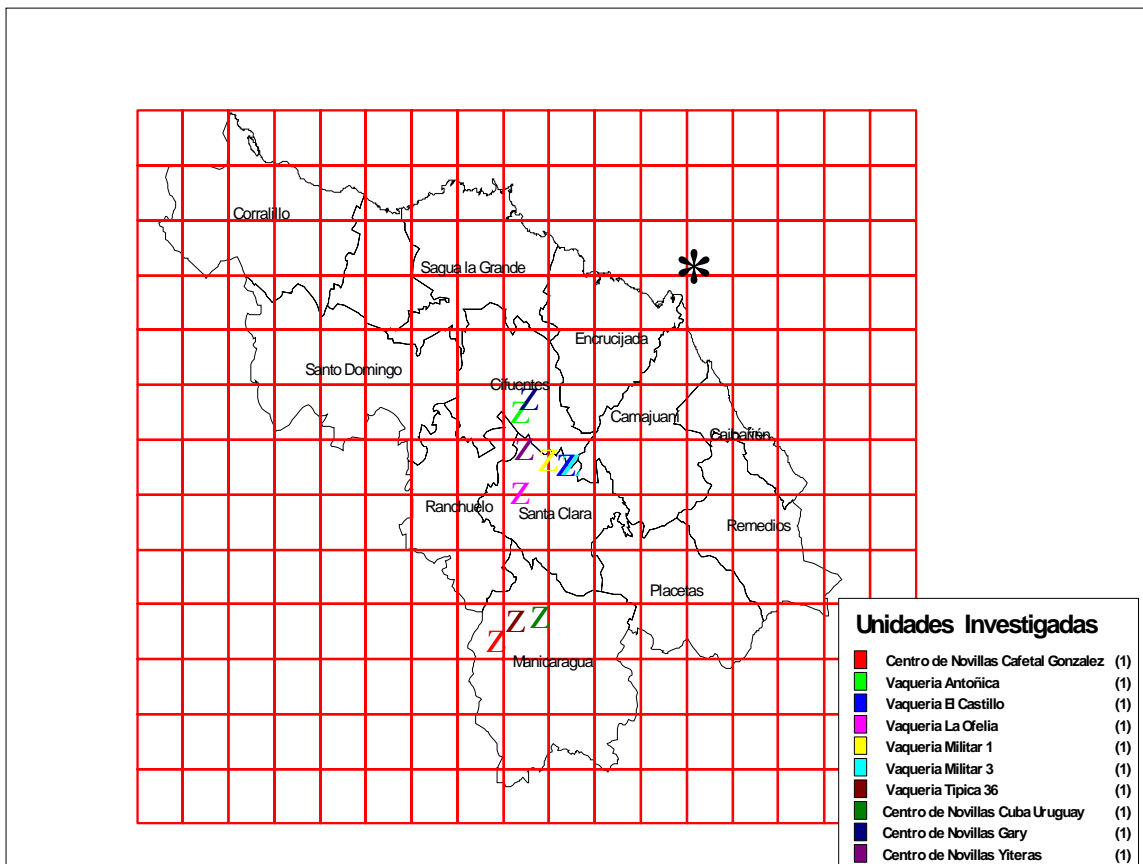
Anexo 4: Metabolismo cúprico a nivel hepático (Dezcalzo, 2003).



Anexo 5: Resumen de la aplicación del método clínico en el diagnóstico de la carencia de Cu en hembras bovinas (Cuesta, 2003)

Diagnóstico	1. Reseña	1. Hembras bovinas
	2. Anamnesis	1. No aportes o administración 2. Región tropical. 3. Suelos 4. Pastos y/o forrajes (Poaceas y/o Fabaceas). 5. Posibles interferencias e interrelaciones. 6.: Indicadores productivos y reproductivos
	3. Exploración clínica o examen físico	1. <u>Inspección</u> .: Pelaje. Coloracion. Eczemas. Condición corporal. 2. <u>Palpación</u> .: (rectal o interna. Órganos reproductivos, ovarios). Es una de las carencias minerales que mayor influencia tiene sobre el desempeño reproductivo; considerándose la segunda más frecuente en bovinos en pastoreo en el mundo después de la de fósforo. 3. <u>Percusión</u> .: (no necesaria; si no hay toxicidad) 4. <u>Auscultación</u> .: (no necesaria, si no hay complicaciones).
	4. Pruebas o Exámenes complementarios	1. Perfil metabólico. Hemoquímica. Hematología general. 2. Determinación de Cu en hígado. 3. Enzimas hepáticas (del eritrocito en investigaciones especiales). 4. Investigaciones del suelo, pastos, agua y demás alimentos 5. Investigaciones especiales sobre molibdeno y de otros principios y elementos con interferencias e interrelaciones con el cobre. Parasitosis de cuajar.
	5. Diagnóstico diferencial	1. Con las carencias de Cu por causas indirectas o secundarias como en la intoxicación con molibdeno o molibdenosis y otras. 2. Otras carencias y/o trastornos nutricionales metabólicos. 3. Patologías pregastricas 4. Otras.

Anexo 6: Mapa de la provincia de villa Clara que muestra las unidades donde se desarrollaron las investigaciones.



Anexo 7: Clasificación de la condición corporal (subjetiva) de la vaca lechera basada en 5 puntos (Parker, 1989).

Descripción	Emanciadada	Flaca	Buena	Excelente	Obesa
Clasificación	1	2	3	4	5
Región o zona					
a) Base de la cola					
Depresión anal	MH	H	LL	AG	MG
Prominencia de la vulva	MP	Pr	N	N	N
b) Pelvis					
Huesos delanteros	MP	S	LS	R	MR
Espacio entre ellos	MH	H	LD	P	R
Huesos posteriores	MH	Pr	V	G	MG
Espacio entre huesos delanteros y traseros	MH	H	MoH	L L	MLL
c) Zona media del lomo					
Columna vertebral	MP	Pr	V	R	MR
Alas de las vértebras	MP	Pr	V	NV	R
Costillas flotantes	MP	Pr	V	V	R

Leyenda:

MH=Muy hundido. H, hundido. LL, lleno. AG, algo gordo. MG, muy gordo.

MP=Muy prominente. Pr, prominente. LS, levemente sólido. N, normal. S, sólido. R, redondo. MR, muy redondo. LD, levemente deprimido. P, plano.

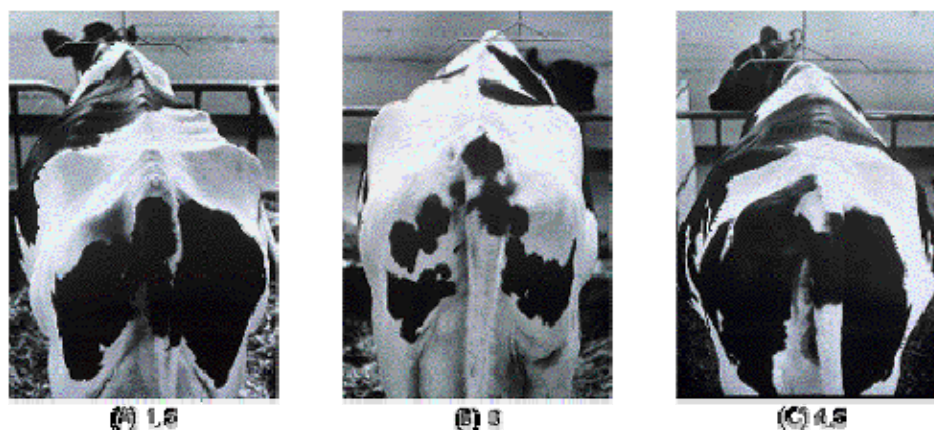
MM=Muy marcado. V, visible. G, grueso o gordo. MoH, moderadamente hundido.

MLL=Muy lleno M

NV= No visible.

(*) Alas o apófisis transversas.

Anexo 8: Fotos de vacas con condiciones corporales de 1 a 2(A), de 3 a 3.5(B) y de 4 a 4.5(C) (Parker, 1989)



Anexo 9: Representación de la Condición Corporal en Vacas Lechera (Parker, 1989).

Grado de condición corporal	Vértice en la espalda	Aspecto posterior del hueso púbico	Aspecto lateral de la línea craneo-occipital	Cantidad craneo-cervical y la tuberosidad loquilloca	
				Aspecto posterior	Aspecto lateral
1 Subcondición cráneica severa					
2 Esqueleto estrecho					
3 Buen balance de esqueleto y tejidos separados					
4 Esqueleto no tan estrecho como tejidos separados					
5 Sobrecruidad cráneica severa					

Anexo 10: Resultados del examen macroscópico de los hígados de los animales tratados con diferentes dosis de Cu y sacrificados a los 5 días post tratamiento.

Resultados del examen macroscópico	Lesiones presentes en la intoxicación cúprica aguda (Jubb y Kennedy, 2007).
<p>Superficie del órgano lisa y de color rojo brillante. Bordes finos lisos y cortantes en todos sus lóbulos. Ausencia de áreas blanquecinas (indican cirrosis). Ausencia de zonas necróticas o degenerativas, ni disminución de la tonalidad. Al corte la consistencia del órgano era remitente, los bordes coaptaban perfectamente. No se apreciaron engrosamientos conectivos de las estructuras alrededor de los conductos. No se apreciaron evidencias de infestación parasitaria del órgano. Cápsula de Glisson con aspecto traslucido. Vesícula biliar de tamaño normal y las vías biliares extrahepáticas se encontraron con buena permeabilidad, la bilis fluida y de color y consistencia normales.</p>	<p>Superficie del órgano de color rojo oscuro. Los bordes son redondeados, con hepatomegalia y zonas difusas con disminución de la consistencia. Vesícula biliar distendida, con bilis fluida.</p>