

ALTERACIONES DEL CICLO ESTRAL PROVOCADAS POR UN ALTO INGRESO DE MOLIBDENO EN VAQUILLONAS BRANGUS Y RESPUESTA A LA SUPLEMENTACIÓN CON COBRE

Brem, J.J.¹, Mestre, J.², Pochon, D.O.¹ y Trulls, H.E.¹. 2001-02. FCV UNNE Rev. Vet. 12/13:1 y 2. Trabajo realizado en el Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias de

Formosa (CEDIVEF), con subsidios otorgados por CONICET.

¹Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.

²Centro Atómico de Ezeiza, Div. Agropecuaria, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Bs. As.

Sitio Argentino de Producción Animal - www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Suplementación mineral](#)

RESUMEN

Las causas de las dificultades reproductivas asociadas a deficiencias de Cu, tanto primaria como secundaria, son muy controvertidas. En la deficiencia secundaria provocada por Mo, los desequilibrios de hormonas hipofisarias y ováricas se adjudican a la acción *per se* del Mo antes que al estatus orgánico de Cu. Los objetivos del trabajo fueron relacionar el comportamiento del ciclo estral en hembras bovinas sometidas a diferentes disponibilidades de Cu–Mo. Se utilizaron diez vaquillonas Brangus (3/4 A.Angus 1/4 Brahman), de 3 años de edad, con celos normales, las cuales alcanzado el peso mínimo de entore, no habían recibido servicio reproductivo. Dos lotes de 5 animales fueron tratados por vía oral con 1100 mg de Mo/día en forma de heptamolibdato de amonio durante 126 días, lo cual implicó que fueron sometidos a un desafío similar al de una pastura con 40 a 50 ppm de Mo en materia seca. Uno de los lotes recibió una dosis única de 0,5 mg de cobre/kg de peso corporal vía subcutánea en el día cero del ensayo. El estado cúprico fue evaluado a través de ceruloplasmina oxidada y cobre hepático y sanguíneo, comprobándose hipocuprosis en el lote tratado solamente con Mo, así como el beneficio del cobre parenteral suministrado al otro lote. Las concentraciones de progesterona sanguínea, obtenidas por radioinmunoanálisis con hormona marcada con durante los seis ciclos estrales esperados, mostró que tres de los animales con molibdenosis entraron en anestro a partir de la mitad del ensayo y los otros dos mostraron una actividad ovárica interrumpida por ciclos ausentes. En cambio, el lote con exceso de Mo pero suple-mentado con Cu, presentó ciclicidad normal. Del análisis estadístico del número total de celos en ambos tratamientos surge un $\chi^2 = 21,82$ ($p < 0.01$). Se concluye que el exceso de Mo afectó significativamente la actividad ovárica y que el tratamiento correctivo de cobre fue suficiente para mantener un ritmo normal de la ciclicidad durante los 4 meses del ensayo. Esto indica que no existió una acción *per se* del exceso de molibdeno sobre la actividad ovárica, sino que las alteraciones observadas fueron provocadas por la deficiencia de cobre secundaria a la molibdenosis.

Palabras clave: bovino, reproducción, ciclo estral, molibdeno, cobre.

INTRODUCCIÓN

Existen opiniones contradictorias respecto a la performance reproductiva asociada a deficiencias de cobre, tanto primaria como secundaria. Algunos sostienen que los anestros, retenciones placentarias y bajas retenciones de servicios en el ganado de cría se corresponden con alteraciones de la química sanguínea entre las que se encuentra la hipocupremia. Asimismo, en bovinos suplementados con cobre se observaron mayores números de celos, mejores tasas de servicio por concepción y elevación en los porcentajes de preñez entre el 10 al 27 % según categorías. Otros, en cambio, no obtuvieron respuesta ante el suministro parenteral de cobre en relación al número de servicios por concepción, intervalos parto–primer celo y tasas de concepción al primer servicio. En este mismo sentido, se responsabilizó a la acción del molibdeno *per se* antes que al status orgánico de cobre, en problemas reproductivos originados por desequilibrios de hormonas hipofisarias y ováricas. Ante lo conflictivo del tema, en el presente ensayo se propuso relacionar el comportamiento del ciclo estral evaluado por los niveles de progesterona sanguínea en hembras bovinas sometidas a diferentes disponibilidades de cobre–molibdeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron diez vaquillonas Brangus (3/4 A.Angus 1/4 Brahman), de 3 años de edad, que clínicamente estaban ciclando, las cuales habiendo alcanzado el peso mínimo de entore de 270 kg, no habían recibido servicio reproductivo. Se las dividió en dos lotes de 5 animales cada uno; ambos grupos fueron tratados por vía oral con

1100 mg de Mo/día en forma de heptamolibdato de amonio durante 126 días. Un lote recibió además, una dosis única de 0,5 mg de cobre/Kg de peso corporal vía subcutánea en el día cero del ensayo con un producto comercial a base de etilenedinitrilotetracetato de calcio y cobre (Glypondin®). Teniendo en cuenta el suministro oral de Mo y el resultado dado por el INTA-Balcarce del análisis químico realizado a la pastura del potrero donde se encontraban, surge que ambos lotes fueron sometidos a un desafío similar al de una dieta con un tenor de Mo = 40–50 ppm/materia seca (relación cobre–molibdeno de 1:7,5), situación ésta corregida con el suministro de cobre parenteral en el otro lote.

Las muestras de sangre para la determinación de progesterona fueron recolectadas con EDTA tres veces por semana y el plasma fue conservado a –20°C hasta su utilización. La determinación hormonal fue realizada por el método del radioinmunoanálisis (RIA) con progesterona marcada con Iodo de alta actividad específica, con anticuerpos obtenidos en conejo “Francia” en título de 1/125.000 y separación de fracciones libre y unida a través de una solución de carbón activado y Dextrán T-70.

Asimismo, cada 2 semanas se tomaron muestras de sangre para efectuar determinaciones de hematocrito (método del tubo capilar con centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos), hemoglobina (método fotolorimétrico de la cianmetahemoglobina con lectura a 540 nm), ceruloplasmina oxidasa (técnica de Rice modificada, utilizando sustrato de p-fenilendiamina en buffer de acetato, lectura a 540 nm) y cupremia (batocuproína, lectura a 480 nm).

Para la determinación de Cobre hepático se extrajeron muestras de hígado mediante punción–biopsia a 2 animales de cada lote en el momento previo, a los 2 y 4 meses de comenzado el ensayo; las concentraciones de cobre se evaluaron mediante método convencional.

Las lecturas fotoloriméricas fueron efectuadas en un espectrofotómetro Coleman Perkin–Elmer 55–B, provisto de microcubeta con vaciado automático. La medición radiactiva del I fue realizada mediante un contador gamma Alfa Nuclear totalmente automatizado y computarizado.

Las variables peso corporal, hematocrito, hemoglobina, cobre sérico y ceruloplasmina oxidasa, fueron analizados por análisis de la variancia mediante un diseño experimental de medidas repetidas en el tiempo. Previo al análisis se probaron los supuestos de normalidad por la técnica de Kolmogorov–Smirnov (corrección de Lilliefors) y el supuesto de homogeneidad de la variancia por la técnica de Levene. Las pruebas de comparaciones múltiples fueron realizadas mediante contrastes ortogonales por el método de Scheffe.

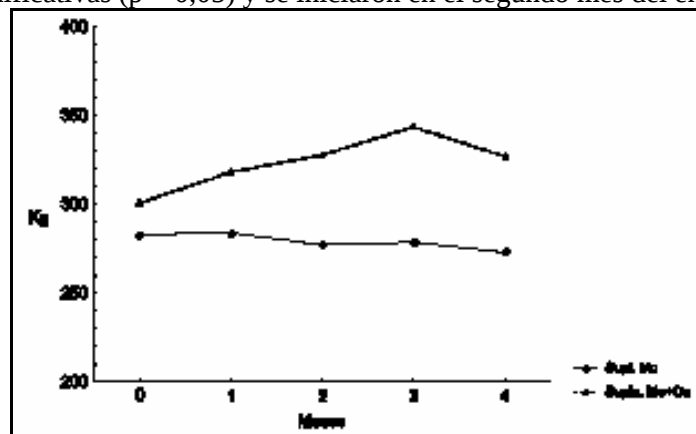
Para la variable cobre hepático, el análisis de la variancia se realizó bajo un diseño en bloques completa-mente aleatorizados, a dos vías: efecto tratamiento (suplementación con molibdeno y con cobre y molibdeno) y efecto bloque (meses de tratamiento). Se probaron los supuestos de independencia de los datos, de normalidad (Wilk–Shapiro) y de homogeneidad de la variancia (Bartlett). En todos los casos las pruebas de hipótesis fueron rechazadas con un α menor de 5 % ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los animales afectados de molibdenosis presentaban retrasos importantes de peso (Figura 1) y un significativo grado de anemia puesto de manifiesto por las disminuciones de hematocrito y hemoglobina (Tablas 1 y 2). Tales declinaciones fueron similares a las observadas anteriormente en la molibdenosis experimental de bovinos y ovinos.

El estado cúprico interno evaluado a través de la actividad de ceruloplasmina oxidasa y las concentraciones de cobre hepático y sanguíneo (Figuras 2 y 3, Tabla 3), revelaron hipocuprosis en el lote que solo recibió un exceso de molibdeno, así como el efecto beneficioso del cobre parenteral suministrado al otro lote. Este comportamiento de la cupremia fue diferente al observado en rumiantes tratados con tetratiomolibdatos, donde se obtuvo un persistente incremento del cobre unido a albúminas plasmáticas, acompañado de una disminución en la actividad de ceruloplasmina oxidasa, aunque ambos procesos parecen no estar relacionados. Es dable destacar la cautela con que deben interpretarse datos obtenidos mediante diferentes metodologías, pues en el último caso la concentración total de cobre se determinó por absorción atómica, en tanto que en el nuestro se usó el método fotolorimétrico de la Batocuproína con desproteinizado previo de la muestra con ácido tricloroacético. Los resultados hacen suponer que si existieron altos contenidos de cobre unido a proteínas, éstos quedaron atrapadas en el precipitado y no estuvieron presentes en el sobrenadante valorado. La concentración de cobre unido a proteínas plasmáticas se puede incrementar por acción de tiomolibdatos tras la formación de complejos insolubles. También se observó que en sueros de ovinos tratados con ácido tricloroacético, se removía en un bajo porcentaje el cobre unido a globulinas y albúminas, especialmente cuando habían recibido tratamiento con tetratiomolibdatos.

Figura 1. Evolución del peso corporal. Las diferencias entre tratamientos fueron significativas ($p < 0,05$) y se iniciaron en el segundo mes del ensayo.



A partir del seguimiento de la progesteronemia a lo largo de los seis ciclos estrales esperados en cada uno de los animales (Figuras 4 y 5), pudo observarse que tres de las vaquillonas molibdenóticas entraron en anestro a partir de la mitad del ensayo y las dos restantes mostraron actividad ovárica interrumpida por ciclos ausentes. En contraposición, los animales con exceso de molibdeno pero suplementados con cobre presentaron ritmo normal de ciclicidad en todos los casos. Del análisis estadístico del número total de celos en ambos tratamientos surge un $\chi^2 = 21,82$ ($p < 0.01$).

En bovinos suplementados con Mo durante períodos muy largos, los ovarios examinados por vía rectal eran pequeños e inactivos; algunos animales tenían ovarios que contenían uno o más quistes foliculares y en ninguno de estos casos pudo detectarse progesterona en plasma. También se registraron incrementos de los episodios de liberación de LH, que aumentaron el crecimiento folicular culminando con el restablecimiento del ciclo ovárico normal. Asimismo, en ensayos de molibdenosis experimental en bovinos, la secreción de LH fue alterada por el Mo dietario, provocando bajas frecuencia de picos y de secreción basal de LH comparada con los controles. Es bien conocido que los períodos de anestro están asociados a escasa liberación de LH, y es probable que ello haya ocurrido en el grupo que solo recibió Mo.

Tabla 1. Evolución del hematocrito (%) en ambos lotes. Las diferencias ($p < 0,05$) se iniciaron al quinto mes.

semanas	promedio		I.C. <95 %		I.C. >95 %		desvío estándar	
	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo
previo	43	43	41	39	46	48	2,19	3,43
2	38	39	37	36	41	42	1,64	2,34
4	39	39	36	35	42	43	2,39	3,08
6	40	42	39	37	42	47	1,30	4,04
8	43	42	40	38	46	46	2,74	3,08
10	36	41	32	37	40	48	3,11	3,96
12	36	40	33	36	40	46	2,88	3,90
14	35	41	29	38	41	43	4,58	1,82
16	35	39	29	36	41	42	5,15	2,74
18	34	37	27	33	40	41	5,32	3,27

Tabla 2. Comportamiento de la hemoglobina (g/dl) en ambos lotes.
Las diferencias ($p < 0,05$) se iniciaron al quinto mes.

semanas	promedio		I.C. <95 %		I.C. >95 %		desvío estándar	
	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo
previo	14,57	14,49	13,34	13,54	15,79	15,44	0,99	0,76
2	13,34	13,59	12,30	12,93	14,37	14,25	0,83	0,53
4	12,47	12,82	11,74	11,50	13,20	14,13	0,59	1,06
6	13,98	14,71	13,07	13,05	14,88	16,38	0,73	1,34
8	14,35	14,52	13,31	13,39	15,38	15,64	0,83	0,91
10	13,20	14,84	11,93	13,12	14,48	16,55	1,03	1,38
12	12,68	14,23	11,29	12,95	14,08	15,51	1,12	1,03
14	11,06	13,42	8,68	12,74	13,43	14,09	1,91	0,54
16	11,29	14,04	8,41	12,69	14,17	15,39	2,32	1,09
18	11,13	12,56	7,48	10,89	14,79	14,22	2,95	1,34

Figura 2. Evolución del cobre sérico. El efecto tiempo detectó diferencias significativas ($p<0,05$).

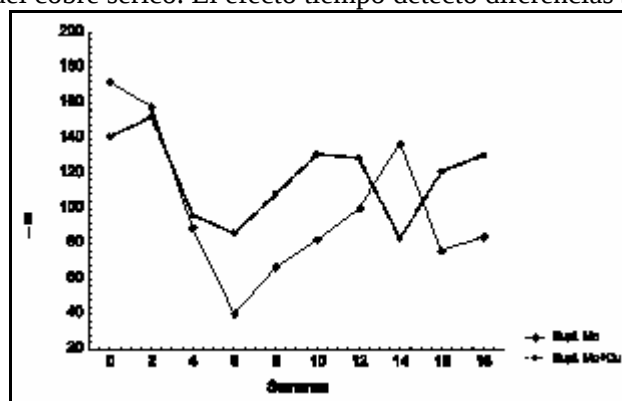
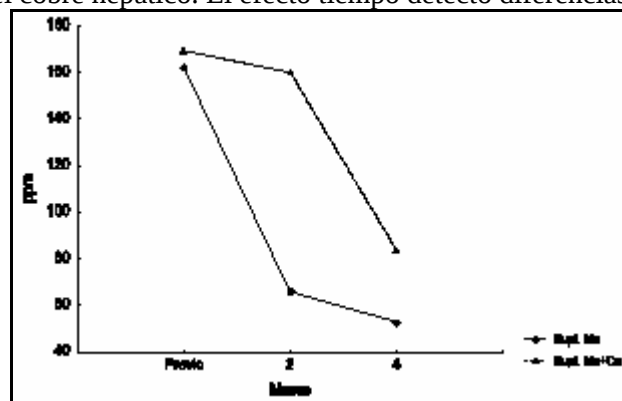


Figura 3. Evolución del cobre hepático. El efecto tiempo detectó diferencias significativas ($p<0,05$).



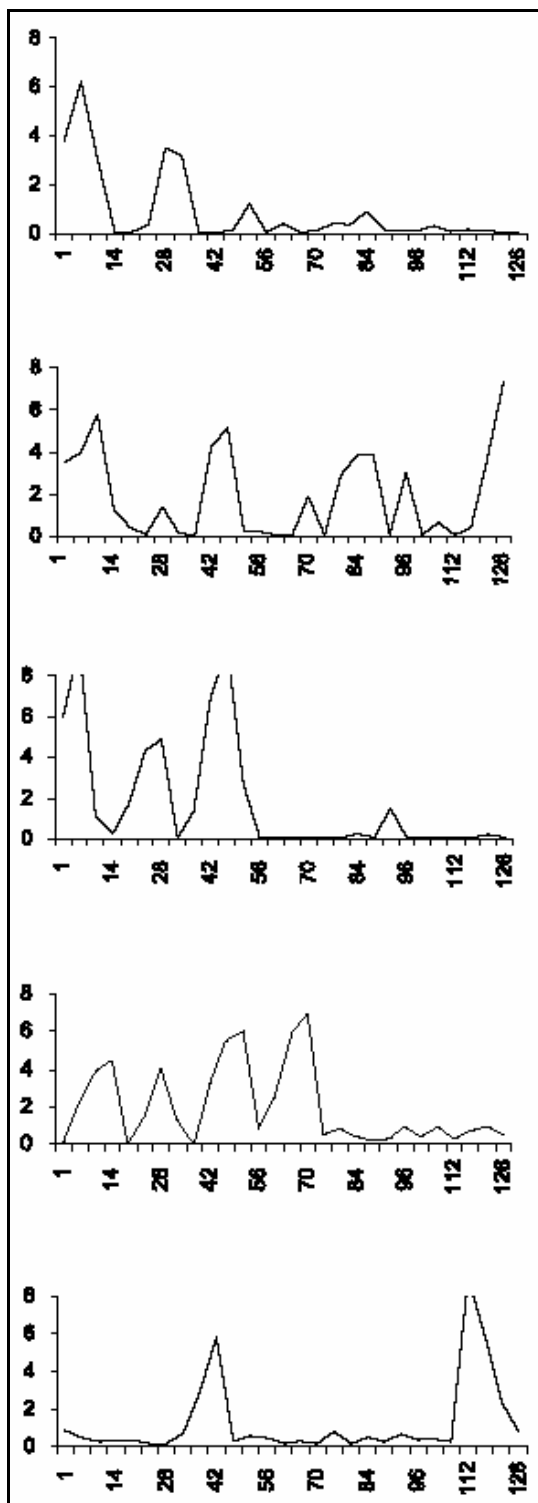


Figura 4: Comportamiento de la progesteronemia en animales del lote que solo recibió Mo

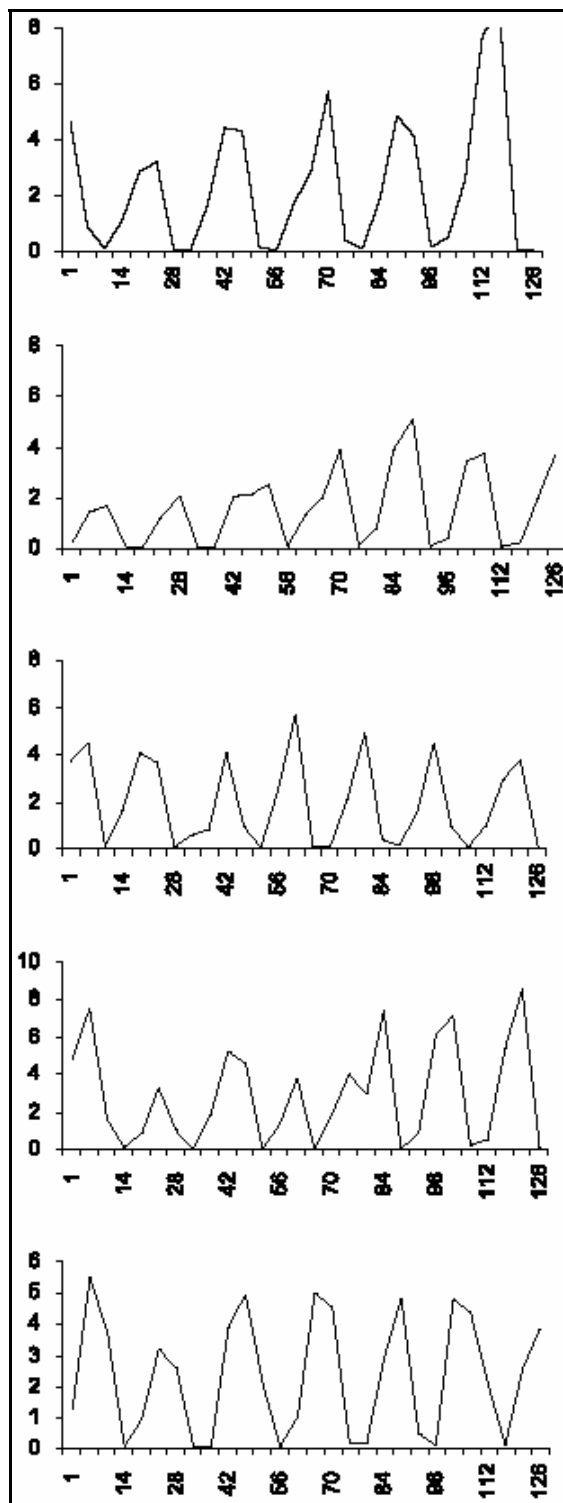


Figura 5: Comportamiento de la progesteronemia en animales que recibieron Mo más suplementación con Cu

Ordenadas: concentraciones hormonales (ng/ml). Abcisas: tiempo (días)

Tabla 3. Actividad de ceruloplasmina oxidasa (U/L) en ambos lotes.
El efecto tiempo detectó diferencias significativas ($p < 0,05$).

semanas	promedio		I.C. <95 %		I.C. >95 %		desvio estándar	
	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo
previo	7,4	7,0	4,2	1,9	10,6	12,2	2,59	4,14
2	10,4	10,8	8,5	6,6	12,2	15,1	1,51	3,48
4	7,2	10,9	3,0	5,1	11,3	16,8	3,37	4,71
6	10,0	10,6	5,4	6,2	14,7	14,9	3,74	3,49
8	9,7	11,3	6,5	8,2	12,9	14,3	2,61	2,47
10	9,5	11,5	6,3	7,3	12,7	15,8	2,60	3,42
12	8,8	11,1	4,8	8,3	12,9	13,9	3,27	2,24
14	7,8	10,3	4,4	8,8	11,2	11,8	2,74	1,20
16	9,2	10,5	6,9	6,1	11,5	14,9	1,86	3,54
18	9,0	10,4	4,1	6,4	13,8	14,3	3,93	3,17

Acorde a estos resultados, se concluye que la actividad ovárica de las vaquillonas fue alterada significativamente por el exceso de Mo y que el tratamiento correctivo con una dosis única de cobre subcutáneo fue suficiente para mantener un ritmo normal del ciclo durante los 4 meses que duró el ensayo. Esto indica que no existió una acción *per se* del exceso de Mo sobre la actividad ovárica, sino que las alteraciones observadas fueron provocadas por la deficiencia de Cu secundaria a la molibdenosis.

AGRADECIMIENTOS

Al Med.Vet. J.P.Roux y al Med.Vet. P.A.Zeinsteger por la valiosa colaboración prestada en la realización del ensayo.

REFERENCIAS

- Auza N. 1983. Le cuivre chez les ruminants. Une revue. *Ann. Rech. Vét.* 14: 21–37.
- Auza N, Acuña C, Casaro JP, Braun JP. 1983. Effects de l'administration de diverses preparations chez de bovis carences en cuivre. *Biologie Prospective. 5 Colloque Inter-national de Pont. a. Mousson. Masson ed., p.* 1145–1147.
- Ayiannidis A, Giroussi S, Oulgaropoulos A. 1996. As-pects of protein bound copper in sheep plasma and its release *in vitro* especially after treatment with ammonium tetrathiomolybdate. *J.Trace Elem.Med.Biol.* 10: 245–250.
- Brem JJ, Roux JP. 1987. Haematological aspects in expe-rimental bovine molibdenosis with and without parenterally copper treatment. *First Congress of Toxicology in develo-ping Countries*, Buenos Aires, p. 23.
- Brem JJ, Roux JP. 1991. Aspectos clínico hematológicos de la molibdenosis experimental en bovinos con y sin trata-miento parenteral de cobre. *Vet. Arg.* 8: 38–49.
- Brem JJ, Pochon DO, Roux JP, Mussart de Coppo NB. 1991. Estudios ferrocínéticos en ovinos sometidos experi-mentalmente a un exceso de molibdeno. *Rev. Med. Vet.* 72 : 229 –239.
- Carrillo BJ, Bingley JB. 1964. Técnica de biopsia de híga-do y análisis de la muestra. *RIA* 1: 103–118.
- Eden A, Green HH. 1940. Microdetermination of copper in biological material. *Biochem. J.* 34: 1202–1208.
- Engel RW, Hardinson WA, Miller RF, Price NO, Huber JT. 1964. Effect of copper intake on concentration in body tissue and on growth, reproduction and production in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 23: 1160–1163.
- Farina JN, Farina JL, Farina CM. 1983. El desbalan-ce mineral como causa de bajos porcentajes de preñez. *Gac.Vet.* 45: 653–656.
- Ferrando R. 1971. Les besoins en oligoelements des ani-maux domestiques et les conséquences de leur carence. *Ann. Nutr. Alim.* 25: 231–235.
- Gonzalez GD, Capaul EG, Silva JH. 1980. Hacienda de cría: estudio de algunos parámetros hemáticos en rodeos problemas. I: Casuística. *Resúmenes del III Congreso Ar-gentino de Cs. Vet.*, Buenos Aires, p. 251.
- Hidiroglou M. 1973. Trace element deficiencies and fertili-ty in ruminants: A review. *J. Dairy Sci.* 62: 1195–1206.
- Hunter AP. 1977. Some nutritional factors affecting the fertility of dairy cattle. *New Zealand Vet. J.* 25: 305–308.
- Lannon B, Mason J. 1986. The inhibition of bovine ceru-loplasmin oxidase activity by thiomolybdates *in vivo* and *in vitro*: a reversible interaction. *J. Inorg. Biochem.* 26: 107–115.
- Mason J, Kelleher CA, Letters J. 1982. The demonstra-tion of protein-bound 99Mo–di and trithiomolybdate in sheep plasma after the infusion of 99Mo–labelled molyb-date into the rumen. *Br. J. Nutr.* 48: 391–397.
- Norheim G, Soli NE, Frosli A, Mjor–Grimsrud M. 1980. Fractionation of soluble molybdenum–binding proteins from liver, kidney, plasma and erythrocytes from sheep supplemented with molybdenum. *Acta Vet. Scand.* 21: 428–437.
- Phillippo M, Humphries WR, Laurence CB, Price J. 1982. Investigation of the effect of copper status and therapy on fertility in beef suckler herds. *J. Agric. Sci.* 99: 359–364.
- Phillippo M, Humphries WR, Garthwaite PP. 1987. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status and growth in cattle. *J. Agric. Sci.* 109: 315–320.
- Poole DBR, Walshe MJ. 1978. Mechanism of the molybdenum/sulfphur antagonism of copper utilization by ruminants. In: *Trace Elements metabolism in man and animals* (CF Mills ed.), Edinburgh, Livingstone, p.448.

21. Rossigneux R. 1978. Metabolic profiles in relation to infer-tility in cattle. *Thesis Ecole Nationale Veterinaire*, Alfort, 91 pp.
22. Sastry KNV, Rao PM, Rai MT, Sundaravadanan AN. 1975. Copper glycinate therapy in repeat breeding cows. *Ind. J. Anim. Res.* 7: 75–79.
23. Whitaker DA. 1982. A field to asses the effect of copper glycinate injections on fertility in dairy cows. *Br.Vet. J.* 138: 40–44.

Volver a: [Suplementación mineral](#)