

Asociaciones entre las concentraciones de cobre sérico, cobre hepático y ceruloplasmina sérica en equinos

Associations between copper concentrations in liver and serum and ceruloplasmin in serum from horses

Pierre Boulou O,¹ MV, Mirela Noro,^{1,2*} Ph.D, Helga Böhmwald L,¹ Esp, Fernando Wittwer M,¹ M.Sc.

¹Universidad Austral de Chile, UACH, Instituto Ciencias Clínicas Veterinarias, Casilla 567, Valdivia, Chile.

²Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brasil. Correspondencia: mirelanoro@gmail.com

Recibido: Junio de 2012; Aceptado: Febrero de 2013.

RESUMEN

Objetivo. Determinar los valores y el grado de asociación entre las concentraciones de cobre (Cu) hepático y sérico y de ceruloplasmina (Cp) sérica en equinos. **Materiales y métodos.** Se utilizaron 38 equinos adultos, beneficiados en plantas faenadoras de la Región de la Araucanía, Chile. Se obtuvieron muestras de sangre por venopunción yugular previo al beneficio para determinar las concentraciones séricas de Cu y de Cp y, de hígado posterior al beneficio para determinar la concentración de Cu. Se calculó los intervalos de referencia y la asociación entre las concentraciones de Cu hepático y sérico y Cp sérica mediante correlación de Pearson y regresión lineal. **Resultados.** Se estimaron intervalos para las concentraciones de Cu hepático (32 - 161 $\mu\text{mol/kg}$ de materia húmeda) y sérico (10 - 24 $\mu\text{mol/L}$) y, para Cp sérica (0.08 - 0.43 ΔDO). Los valores de Cu hepático, al ser comparados con los reportados por la literatura, indican que los animales presentaron un nivel adecuado de Cu, a excepción de 1 caballo, que se encontró bajo el límite inferior. La cupremia se asoció con la concentración sérica de Cp ($r=0.49$; $p<0.05$), no apreciándose asociación entre las otras variables ($p>0.05$). **Conclusiones.** Las concentraciones de Cu hepático de equinos adultos, beneficiados en plantas faenadoras de la Región de la Araucanía, Chile, se encontraron dentro de los intervalos descritos en la literatura. Las concentraciones de Cu hepático no se asociaron con las de Cu o Cp séricas.

Palabras clave: Ceruloplasmina, cobre, equinos, hígado, suero (*Fuente: MeSH*).

ABSTRACT

Objective. The aim of this study is to determine the reference intervals and the associations between the concentrations of liver and blood serum copper (Cu) and serum ceruloplasmin (Cp) in horses. **Materials and Methods.** Thirty eight adults horses slaughtered in the Araucania Region, Chile, were used for this study. Blood samples were obtained by jugular venipuncture for determination of serum Cu and Cp concentrations and a sample of liver, 10 g, was obtained after the animal was slaughtered to determine Cu concentration. The reference intervals were calculated and the correlation between serum and liver Cu concentration and serum Cp were determined using Pearson correlation and lineal regression. **Results.** Reference interval values for liver Cu (32 -161 mmol/kg wet matter), serum Cu (10 - 24 mmol/L) and Cp (0.08 -0.43 ΔDO) concentrations were established. Horses had adequate Cu status according with the liver Cu values, when compared with literature, except one horse which was under the lower reference limit. Serum concentrations of Cu and Cp were associated ($r=0.49$, $p<0.05$); but no appreciable association between the other variables ($p>0.05$) was found. **Conclusions.** Liver Cu concentrations of adult horses slaughtered in the region of Araucania, Chile, are within the intervals described in the literature. Liver Cu concentration was not associated with serum concentration of Cu or ceruloplasmin, and a moderate association between these last two variables was found.

Key words: Ceruloplasmin, copper, horses, liver, serum (*Source: MeSH*).

INTRODUCCIÓN

El cobre (Cu) es un mineral traza, multifuncional, esencial para el crecimiento y la hematopoyesis en las especies domésticas. Su mayor importancia radica al ser constituyente de diversas metaloenzimas identificadas tanto en el espacio intracelular como extracelular del organismo animal (1).

El balance del Cu es controlado por su tasa de absorción, la cual es regulada por la metalotioneina, cuproproteína que liga al Cu desempeñando un rol importante en su absorción y excreción en el intestino (1).

Los requerimientos de Cu en la dieta de un equino adulto son habitualmente de 10 mg/kg MS, aumentando en condiciones de gestación y lactancia (2). En potrillos entre 2 a 4 meses de edad sus requerimientos varían de 8 a 25 mg/kg MS (1). A la vez, el contenido de Cu del forraje depende del área geográfica, clima y composición del suelo y la pradera (3).

Posterior al ingreso al torrente sanguíneo, el Cu se liga a la albúmina y los aminoácidos, siendo en esta forma transportado al hígado y a otros órganos (1). En el hepatocito el Cu absorbido es incorporado a la ceruloplasmina (Cp), metalotioneina o proteínas de elevado peso molecular y excretada por la bilis (3). El hígado es el responsable de la homeostasis del Cu, actuando como órgano de reserva corporal, incorporando Cu a la Cp y controlando su egreso por medio de la excreción biliar. La mayor parte del Cu plasmático se encuentra formando parte de la Cp, el resto forma complejos con albúmina y globulinas. Además, el Cu también se secreta en la leche y se excreta en la orina y las heces (1).

La distribución del Cu dentro del cuerpo del equino es variable. Mayormente se encuentra distribuido en la musculatura (61%), otros órganos como riñón e hígado (25%) y en menores cantidad en sangre (5.5%), huesos (5%) y pelo (2.7%) (4).

La carencia de Cu se presenta en animales cuya ingesta o absorción es deficitaria. En estos casos, se producen alteraciones que se manifiestan bioquímica y clínicamente (1). En equinos la carencia de minerales traza es una de las mayores causas de enfermedades ortopédicas del desarrollo. La carencia de Cu es causa de osteocondrosis y otros desórdenes del desarrollo (3). Aparentemente, existe una relación entre las bajas concentraciones de Cu plasmático y las hemorragias en hembras parturientas de edad avanzada, situación que se debería a una disminución en la absorción de Cu o en la habilidad de movilizar sus reservas hepáticas (2). Estos antecedentes señalan la importancia de realizar el diagnóstico de la carencia de Cu, tanto en situaciones de campo como experimentales. Para lo cual se requiere de criterios diagnósticos definidos, los que en equinos son escasos (3).

El balance metabólico de Cu se determina mediante los análisis de los compartimientos de reserva mediata, a través del contenido de Cu hepático, y de reserva inmediata o circulante, estimado por la concentración sanguínea de Cu y de Cp (1). Para dicho efecto se requiere de intervalos de referencia para sus concentraciones, los que en equinos son amplios y diversos (1, 2). Idealmente, para mejorar la sensibilidad diagnóstica frente a un desbalance de este mineral se debe establecer intervalos de referencia acorde a las condiciones locales y de cada laboratorio.

Boulou - Asociaciones entre las concentraciones de cobre sérico, hepático y ceruloplasmina 3893

El objetivo del estudio fue determinar intervalos de referencia para las concentraciones de Cu hepático y sérico y de Cp sérica en equinos y su grado de asociación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron 38 equinos adultos, mayores de 2 años, hembras (n= 12) y machos (n=26), mestizos con predominio de las razas Criollo Chileno y Fina Sangre Inglés, sanos, precedentes de distintas regiones de Chile, alimentados con dieta basada mayormente en el consumo de forrajes frescos, heno y en algunos casos suplementados con granos, mayormente avena, beneficiados en las plantas faenadoras de Nueva Imperial (n=18), Chol-Chol (n=10) y Galvarino (n=10), Región de la Araucanía, Chile.

Obtención y análisis de las muestras. Muestras de sangre para suero se obtuvieron por venopunción yugular, previo al beneficio de los animales. Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta la liberación del suero y luego centrifugadas a 780 g durante 5 minutos (Beckman model TJ6®). Dos ml de suero se recolectaron en microtubos de 1.5 ml y almacenados a -25°C hasta su posterior análisis.

Una muestra de 10 g de hígado de cada equino se obtuvo posterior a su beneficio, la cual se congeló a -25°C hasta su digestión y análisis. De cada muestra, se obtuvieron 2 alícuotas de 1 g de hígado cada una, las que fueron maceradas y digeridas en 10 ml de una mezcla 1:4 de ácido perclórico y ácido nítrico. La digestión se efectuó en dos fases; en la primera se realizó una digestión a temperatura ambiente, permaneciendo cada muestra cerca de 15 horas en un matraz, hasta conseguir la digestión del tejido. En la segunda fase los matraces fueron colocados sobre una placa temperada a 150°C hasta lograr la digestión y evaporación total del material orgánico. Posteriormente, el material residual fue reconstituido con 10 mL de HCl al 5% y almacenado en envases plásticos debidamente rotulados hasta su análisis.

La determinación de las concentraciones de Cu sérico y hepático se realizó, en duplicado, utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer 2380, USA) a 324.8 nm en muestras diluidas 1:1 con cloruro de lantano al 0.1%. La calibración de los equipos se realizó empleando un estándar comercial de Cu diluido a concentraciones de 0, 15, 30 y 45 µmol/L. Los resultados de Cu sérico se presentan como µmol/L de suero y los de Cu hepático como µmol/kg de materia húmeda (MH).

La determinación de la Cp sérica se realizó por duplicado mediante el método de la reacción de ferroxidación con p-fenilenediamina (PPD) (5), determinando el cambio de absorbancia de la reacción enzimática a 530 nm y 37°C utilizando buffer acetato pH 6.6 (6), en un espectrofotómetro Hitachi 4020® (Boehringer Mannheim). Su resultado se presenta como el cambio de absorbancia (ΔDO) producido por la reacción enzimática durante 1 minuto en las condiciones del ensayo.

Análisis estadístico. Los intervalos de referencia de los valores se establecieron en base a las normas de la American Society of Veterinary Clinical Pathology, ASVCP. La distribución de los datos y la inexistencia de posibles *outliers* fue determinada mediante histogramas (Figura 1). Posteriormente, se determinó la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los límites de referencia inferior (LIR) y superior (LSR) se calcularon utilizando el método robusto. Los datos fueron analizados con el software MedCalc v.12.2.1 para Windows (MedCalc Software, Belgium).

La asociación entre las tres variables se establecieron mediante correlación de Pearson y regresión lineal simple, considerando como significativo $p < 0.05$. Además, la normalidad de la distribución de los datos, se realizó a través de la prueba de Shapiro-Wilk en el programa IBM SPSS 19.0.

RESULTADOS

Los valores descriptivos y los intervalos de valores observados se muestran en la tabla 1 y la distribución de los valores en histogramas se observan en la figura 1.

Tabla 1. Estadística descriptiva e intervalos de confianza (IC) de 90% para los límites inferior (LIR) y superior (LSR) de referencia de las concentraciones de Cu hepático y sérico y de ceruloplasmina sérica en 38 equinos.

	Cu hepático µmol/kg MH	Cu sérico µmol/L	Ceruloplasmina ΔDO
Media	100.5	17.4	0.27
DE	31.3	3.4	0.08
Mediana	97.5	17.0	0.26
Mínimo	50.0	12.0	0.15
Máximo	210.0	25.0	0.52
IC (LIR-LSR)	32.0 - 161.0	10.3 - 24.2	0.08 - 0.43
90% IC LIR	13.0 - 51.0	8.6 - 11.6	0.04 - 0.13
90% IC LSR	141.0 - 180.0	22.4 - 25.7	0.38 - 0.48

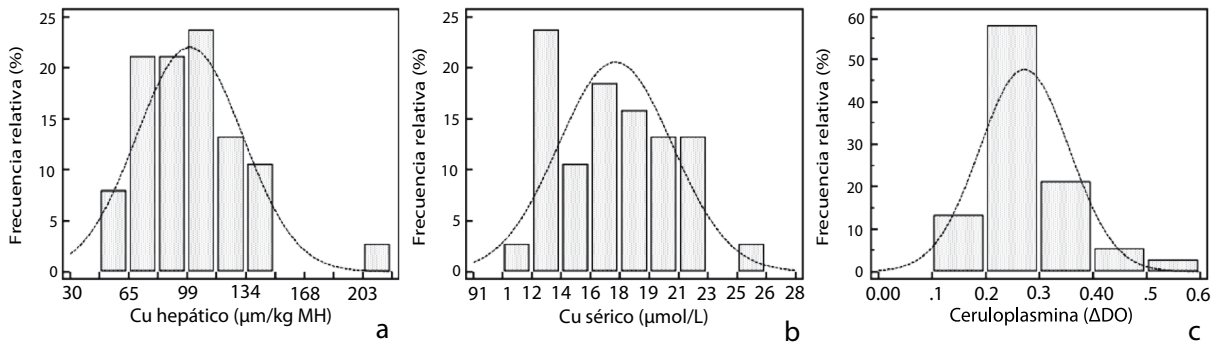


Figura 1. Frecuencia y curva de distribución de las concentraciones de cobre hepático (a) y sérico (b) y de ceruloplasmina sérica (c) de 38 equinos.

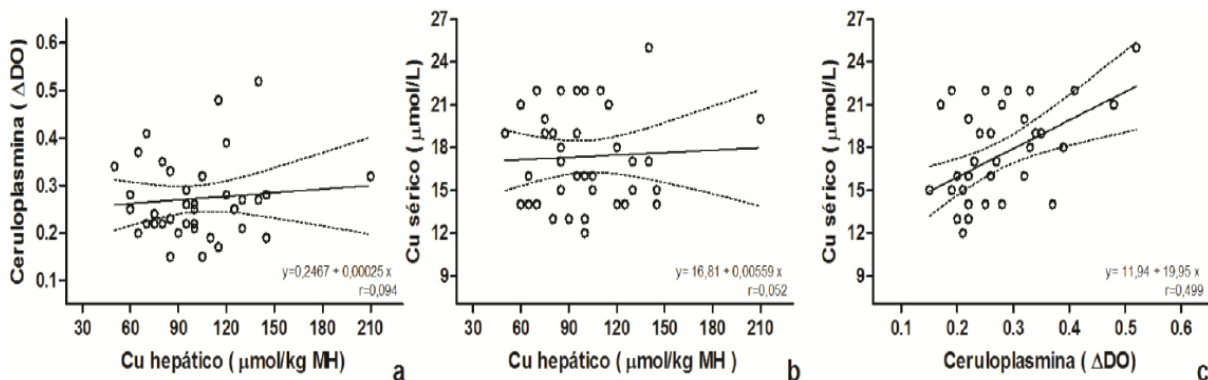


Figura 2. Regresión lineal (\pm IC 95%) y correlación entre las concentraciones de Cu hepático y ceruloplasmina sérica (a), Cu hepático y Cu sérico (b), y entre ceruloplasmina y Cu séricos (c) en 38 equinos.

La concentración de Cp sérica se asoció positivamente con la de Cu sérico ($r=0.498$; $p<0.05$; Figura 2c), pero no con las de Cu hepático ($r=0.094$; $p>0.05$; Figura 2a). Tampoco se observó asociación entre las concentraciones de Cu hepático y sérico ($r=0.052$; $p>0.05$; Figura 2b).

DISCUSIÓN

Los valores de Cu hepático (50-210 $\mu\text{mol/kg MH}$, Tabla 1) indican que los caballos presentaron concentraciones dentro de los intervalos señalados por la literatura, los cuales son amplios y variados, entre 157-787 $\mu\text{mol/kg MS}$, con una mayor proporción de animales entre 236 a 472 $\mu\text{mol/kg MS}$ (2); describiéndose también intervalos más estrechos (270-330 $\mu\text{mol/kg MS}$) (7), y bajos (100-200 $\mu\text{mol/kg MS}$) (1). Al respecto se debe considerar que en la literatura los valores son informados mayormente en base

a MS, así para transformar de MH a MS hay que dividir por el factor de conversión 3.5 o 4.0 (8). De modo que se consideraría valores adecuados cuando la concentración de Cu hepático se encuentre $>63 \mu\text{mol/kg MH}$; y deficiente cuando $<55 \mu\text{mol/kg MH}$ (8). Cabe señalar que sólo 1 de los caballos estudiados presentó un valor bajo dicho límite.

El hígado constituye el órgano principal de almacenamiento de Cu en las especies domésticas (1), por lo que su concentración es considerada el indicador más sensible a cambios del balance nutricional. Es el primer órgano en que se logra detectar la depleción de Cu en cuadros carenciales de este mineral, proporcionando un índice útil de la reserva de Cu y del grado de carencia en el organismo, pero no necesariamente de las funciones comprometidas (1).

Las reservas hepáticas se agotan cuando en el hígado hay una depleción del 75% de su

Boulou - Asociaciones entre las concentraciones de cobre sérico, hepático y ceruloplasmina 3895

capacidad de almacenamiento, solo posterior a ello pueden presentarse signos clínicos por carencia de Cu (9).

Sólo 1 de los caballos presentó un valor de Cu sérico bajo el mínimo indicado por la literatura (13–32 $\mu\text{mol/L}$) (8), mientras que el resto de animales se ubicó dentro de los intervalos de referencia. Este valor bajo podría ser atribuido a imprecisiones en los valores de referencia, así como al tipo de muestra obtenida. Similar a lo observado con los valores de Cu hepático, los intervalos de referencia de Cu sérico descritos en la literatura, además de la ya citada, son amplios y divergentes, variando de 16.5–20.0 $\mu\text{mol/L}$ (10) hasta 9.9 – 30.9 $\mu\text{mol/L}$ en animales a pastoreo o de 7.4–17.5 $\mu\text{mol/L}$ en caballos estabulados (7). Esta variabilidad en los intervalos dificulta el diagnóstico de cuadros carenciales o tóxicos por Cu. También, debemos considerar que los valores en el suero son inferiores a los valores plasmáticos (1), lo que puede producir confusión en la interpretación de los resultados.

La concentración sérica de Cp presentó un intervalo de 0.15 a 0.52 ΔDO , con un coeficiente de variación de 29.6%. Estos resultados si bien no son comparables con otros estudios en que se utiliza técnicas y condiciones analíticas distintas, presentaron menor coeficiente de variación que el observado en equinos sanos (~31–33%), (11,12) o con alteraciones intestinales (67%), (11); sin embargo, superior a los resultados observados en ponis (4.9%), (13). Por otra parte, cuando se compara los valores obtenidos (Tabla 1) con los reportados en potrillos con una técnica similar, los cuales fueron inferiores ($0.57 \pm 0.17 \Delta\text{DO}$), (14). Hay que señalar que si bien la técnica es la misma, el pH óptimo de la técnica para la determinación de la concentración sérica de Cp en los equinos es de pH 6.6 y en los bovinos de pH 6.4 (6).

La dispersión de los valores observados en las concentraciones de Cu en hígado y suero, así como en la concentración sérica de Cp pueden atribuirse a variaciones individuales, fisiológicas y ambientales tales como, diferencias en edad, raza, estado fisiológico, aporte de Cu y presencia de antagonistas del Cu en la dieta, como el molibdeno (1). Además, animales que cursan con procesos inflamatorios incrementan la concentración sérica de Cp por ser una proteína de fase aguda positiva (11). Los animales del presente estudio eran mestizos, adultos, de buena condición corporal no presentaban signos clínicos ni posmortem de enfermedad.

No se encontró relación entre las concentraciones de Cu hepático y sérico ($r= 0.052$), coincidente con lo descrito en la literatura (7), valor inferior al descrito en otro estudio en el cual se encontró una asociación significativa ($r=0.409$), (10). Diferencia atribuible al hecho cuando se presenta una carencia metabólica de Cu se producen primariamente una disminución en la concentración hepática y sólo cuando ésta es inferior al 25% comienza a disminuir su concentración plasmática (1).

La Cp es una α -globulina, sintetizada en los hepatocitos y constituye la principal proteína transportadora de Cu en la circulación; encontrándose mayormente en el plasma donde se considera un reactante de fase aguda de la inflamación. Contiene 6 átomos por lo que su concentración sérica disminuye en animales con carencia de Cu (1). En los equinos transporta cerca del 70–75% del Cu sérico total, valor considerablemente menor que en otras especies, donde transporta cerca del 90–95% (15), diferencia que ayuda a explicar la baja asociación observada entre las concentraciones séricas de Cu y de Cp ($r=0.498$), comparada a la descrita en otro estudio en potrillos ($r=0.741$), (14). La concentración de Cp permite evaluar el balance metabólico de Cu, siendo utilizada para el diagnóstico de su carencia (1). Cuando se agotan las reservas hepáticas, o bien estas no pueden ser movilizadas suficientemente rápido para suplir, se produce inicialmente la reducción de la concentración sérica de Cp y seguidamente, un declive progresivo de las concentraciones de Cu en el plasma y de las enzimas funcionales relacionadas con Cu (1).

El estudio entrega valores regionales de las concentraciones de Cu hepático y sérico así como de la Cp, permitiendo así precisar alteraciones de desbalances del elemento en la producción y clínica de equinos. Además, los valores de Cu hepático podrán constituir una herramienta diagnóstica para uso en el *pos-mortem*.

Se concluye que las concentraciones de Cu hepático de equinos adultos, beneficiados en plantas faenadoras de la Región de la Araucanía, Chile, se encuentran dentro de los intervalos descritos en la literatura; y que no existe asociación entre las concentraciones de Cu hepática con las de Cu o Cp séricas y la observada entre estas últimas es menor que la descrita para bovinos.

REFERENCIAS

1. Suttle NF. Mineral nutrition of livestock. 4th ed. UK: CAB International; 2010.
2. McDowell LR. Minerals in animal and human nutrition. 2th ed. Gainesville, Florida, USA:Academic Press, Inc; 2003.
3. Cymbaluk NF, Smart ME. A review of possible metabolic relationships of copper to equine bone disease. *Equine Vet J* 1993; 25:19-26.
4. Grace ND, Pearce SG, Firth EC, Fennessy PF. Content and distribution of macro- and micro-elements in the body of pasture-fed young horses. *Aust Vet J* 1999; 77:172-176.
5. Ravin HA. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *J Lab Clin Med* 1961; 58:161-168.
6. Okumura M, Asano M, Fujinaga T. Consideration of the optimum pH for the analysis of serum p-phenylenediamine oxidase activity in thoroughbred horses. *J Vet Med Sci* 1997; 59:137-139.
7. Radostits O, Gay C, DC B, KW H. *Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9 ed. Madrid: McGra-Hill; 2002.
8. Puls R. Mineral levels in animal health: diagnostic data. Clearbrook, British Columbia, Canada: Sherpa International; 1994.
9. Smith B, Coup MR. Hypocuprosis: a clinical investigation of dairy herds in Northland. *N Z Vet J* 1973; 21:252-258.
10. Suttle NF, Small JN, Collins EA, Mason DK, Watkins KL. Serum and hepatic copper concentrations used to define normal, marginal and deficient copper status in horses. *Equine Vet J* 1996; 28:497-499.
11. Di Filippo PA, da Silva Nogueira AFS, Santana AE. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina, α 1-glicoproteína ácida, transferrina e α 1-antitripsina, em equinos com cólica. *Ciência Rural* 2011; 41:2108-2113.
12. Nazifi S, Saeb M, Khoshvaghti A. Studies on the relationship between haemoglobin types of adult Turkoman horses and the concentrations of haemoglobin, copper, ceruloplasmin and iron. *Comp Clin Path* 2003; 12:53-56.
13. Nazifi S, Rategh S. Haemoglobin types and blood concentrations of haemoglobin, copper, ceruloplasmin and iron in adult Caspian miniature horses. *Revue Méd Vét* 2005; 156:50-52.
14. Okumura M, Asano M, Tagami M, Tsukiyama K, Fujinaga T. Serum copper and ceruloplasmin activity at the early growing stage in foals. *Can J Vet Res* 1998; 62:122.
15. Auer DE, Seawright AA. Assessment of copper and zinc status of farm horses and training thoroughbreds in south-east Queensland. *Aust Vet J* 1988; 65:317-320.