

## ALTERACIONES OXIDATIVAS Y DAÑO EN EL ADN EN BOVINOS CON HIPOCUPROSIS

Picco SJ<sup>1</sup>, Fazzio LE<sup>2</sup>, Rosa D<sup>3</sup>, Pintos ME<sup>4</sup>, Furnus CC<sup>1</sup>,  
Dulout FN<sup>1†</sup>, Mattioli GA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA);

<sup>2</sup>Cátedra de Clínica de Grandes Animales; <sup>3</sup>Cátedra de Fisiología;

<sup>4</sup>Laboratorio Central de Análisis Clínicos.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

**RESUMEN:** La hipocuprosis bovina es una de las principales enfermedades nutricionales que afectan al ganado en pastoreo. Observaciones preliminares realizadas en bovinos hipocuprosos sugieren que el daño en la molécula de ADN podría ser una de las primeras consecuencias de la enfermedad. Dicho efecto podría verse relacionado con una disminución de la capacidad orgánica antioxidante. El presente trabajo pretende establecer la existencia y precocidad de aparición del daño en el ADN (medido mediante el empleo del ensayo cometa), y su vinculación con la capacidad orgánica antioxidante, valorada a través de la actividad Cu/Zn-superoxido dismutasa y a través del índice de peroxidación (IP) y composición de ácidos grasos de eritrocitos Cu-deficientes. Los resultados obtenidos demuestran un alto grado de asociación entre cupremia y daño en el ADN, concomitantes con un incremento en el porcentaje de ácidos grasos saturados en glóbulos rojos, indicando una alteración oxidativa. La misma no sería causada por la Cu/Zn-Superoxido dismutasa dada la lentitud en su afectación. En conclusión, la deficiencia de Cu provoca la producción precoz de daño en la molécula de ADN, participando probablemente en la génesis de dicho daño la alteración de la capacidad orgánica antioxidante, la cual no estaría directamente relacionada con la actividad SOD.

**PALABRAS CLAVES:** alteraciones oxidativas; daño en el ADN; hipocuprosis bovina

## OXIDATIVE DAMAGE AND DNA DAMAGE IN CATTLE WITH HYPOCUPROSIS

**ABSTRACT:** Hypocuprosis is the most widespread mineral deficiency affecting grazing cattle. Preliminary reports suggest that DNA damage is one of the most precocious consequences of copper deficiency. This effect might be related to a decrease in the organic antioxidant capacity. The present study was carried out to establish the existence and speed of DNA damage measured by the comet assay. Besides, its relation to the organic antioxidant capacity (measured by the activity of Cu/Zn-superoxide dismutase), the peroxidative index and fatty acid composition of erythrocytes were investigated. The results showed a high correlation between cupremia and DNA damage, with an increase in the saturated fatty acid composition of erythrocytes, suggesting the oxidative origin of the damage. However, the activity of Cu/Zn superoxide dismutase may not directly related to oxidative damage because a low diminishing. In conclusion, copper deficiency give rise to a precocious DNA damage, related to an alteration in the antioxidant capacity, which was not directly associated to a SOD activity.

**PALABRAS CLAVES:** oxidatives alterations; DNA damage; bovine hypocuprosis.

Fecha de recepción: 11/07/06

Fecha de aprobación: 02/02/07

**Dirección para correspondencia:** Sebastián J. Picco, Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA). C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

**E-mail:** spicco@fcv.unlp.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

La hipocuprosis bovina es una de las principales enfermedades nutricionales que afectan al ganado en pastoreo en Argentina y en el mundo. Por su alta incidencia es considerada la segunda deficiencia mineral en importancia a nivel mundial (1). En Argentina ha sido reportada entre otras en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Chaco, Formosa y Entre Ríos (2), pero es sin dudas en la cuenca deprimida del Río Salado (Provincia de Buenos Aires) donde adquiere mayor importancia, afectando normalmente a más del 50% de los bovinos adultos criados en pastoreo y hasta el 70% de los terneros (3).

Dentro del organismo el cobre (Cu) se halla asociado a enzimas, las cuales están involucradas en numerosos procesos biológicos vinculados con el crecimiento y desarrollo, reproducción y con la respuesta inmune (3, 4). Durante la deficiencia se produce la alteración del funcionamiento de estas enzimas (también denominadas cuproenzimas), fenómeno que se vincula directamente con la aparición de los signos clínicos y subclínicos de la enfermedad, entre los cuales los más comunes son la despigmentación del pelo, anemia, fracturas espontáneas, degeneración miocárdica, hipomielinización de la medula espinal, menor performance reproductiva, alteraciones inmunológicas y menores ganancias de peso (2, 5).

Una de las consecuencias recientemente reportadas y estudiadas es la producción de daño en el ADN durante la deficiencia de cobre. Dichos trabajos incluyen desde observaciones realizadas en cultivos de células deprivadas de Cu, hasta ensayos en animales de laboratorio e incluso en animales bajo condiciones de deficiencia natural (6, 7, 8, 9, 10, 11). El principal argumento utilizado para justificar este fenómeno ha sido la potencial alteración de las defensas antioxidantes naturales, producto de una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes mayores [como la Cu/Zn-superoxido dismutasa (Cu/Zn-SOD)] y de enzimas antioxidantes menores [ceruloplasmina (Cp)], concomitantes con un efecto prooxidante derivado de la alteración de la función de la enzima de la cadena respiratoria citocromo c-oxidasa (CCO) (12). Dicho argumento ha sido ratificado en numerosas ocasiones por el hallazgo de disminuciones en la actividad de las citadas enzimas, así como por la observación de lesiones oxidativas reportadas en diferentes trabajos (12,13,14,15,16).

Observaciones preliminares realizadas en bovinos en pastoreo durante el desarrollo de la deficiencia de Cu sugieren que el daño en la molécula de ADN podría ser una de las primeras consecuencias de la enfermedad (10), la cual se presentaría con antelación a la aparición de los signos clínicos y productivos de la enfermedad. Por otra parte, existen evidencias de que dicho

efecto podría verse relacionado con una disminución de la capacidad orgánica antioxidante durante el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es establecer la existencia de daño en el ADN en bovinos Cu-deficientes, la precocidad de aparición de dicha alteración y su vinculación con la capacidad orgánica antioxidante, valorada a través de la actividad Cu/Zn-superoxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) y a través del índice de peroxidación (IP) y composición de ácidos grasos de eritrocitos Cu-deficientes.

## MATERIALES Y METODOS

Para establecer la asociación existente entre daño en el ADN y la deficiencia de Cu, así como su posible origen se realizaron tres tipos de ensayos: a) ensayo A: Determinación de daño en la molécula de ADN y asociación con niveles de cupremia. b) ensayo B: determinación de la actividad de la enzima Cu/Zn-superoxido dismutasa durante el desarrollo de la carencia y C) ensayo C: Determinación de alteraciones oxidativas.

*Establecimiento y animales:* para el desarrollo de los diferentes ensayos se utilizaron bovinos de rodeo general (ensayo A) y el rodeo de bovinos de carne de la Estación Experimental "Chascomus" (Gobierno de la Provincia de Buenos Aires) (ensayos B y C). En este último caso, se seleccionaran al azar 60 terneros, los que se dividieron en:

Lote A: integrado por 30 animales identificados con doble caravana, que se utilizaron para el estudio de las consecuencias de la enfermedad (grupo de estudio) y Lote B (grupo control): integrado por los restantes 30 animales, los cuales se identificaron con doble caravana y se los suplemento regularmente con sales de Cu por vía parenteral (1 mg de Cu-Ca EDTA por kpv).

*Muestras:* En todos los casos se obtuvieron muestras de sangre por punción yugular, las que se recolectaron en tubos previamente heparinizados o tratados con EDTA según la determinación a realizar. En el caso del ensayo B los muestreos se realizaron a partir de los 3 meses de edad y hasta el destete (7 meses) cada 45 días.

### Diseño experimental

Ensayo A: muestras de sangre de 304 animales pertenecientes a diferentes establecimientos ganaderos (n= 10) fueron utilizadas para establecer la concentración plasmática de Cu (cupremia) y el nivel de daño en el ADN mediante el empleo de la electroforesis en gel de células aisladas (ensayo cometa, versión alcalina).

Ensayo B: en 10 animales de cada lote se realizó la determinación de actividad Cu/Zn-SOD cada 45 días, así como la concentración plasmática de Cu.

Ensayo C: se obtuvieron muestras de san-

gre de 10 animales pertenecientes al lote A y 10 del lote B. Dichas muestras se utilizaron para determinar la frecuencia de células con daño en el ADN, el índice de peroxidación eritrocitaria y la composición de ácidos grasos eritrocitaria.

#### **Determinación de cobre en plasma:**

La sangre fue centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm hasta la obtención de plasma. Una alícuota de plasma homogeneizada (1 ml) se desproteinizó en cantidades iguales con ácido tricloroacético al 10 % (peso/volumen). La muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y en el sobrenadante se midió la concentración de Cu en plasma por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), empleando la técnica descrita por Pipper y Higgins (17) en un equipo modelo GBC 902, con llama de aire y acetileno, tipo oxidativa y a 324.7 nm de longitud de onda. Se preparó una curva de calibración de tres puntos (25, 50 y 100 µg/dl), empleando una mezcla de agua desionizada y ácido tricloroacético al 10% en partes iguales como blanco y diluyente de los estándares.

#### **Determinación de la actividad Superóxido dismutasa eritrocitaria (SODe):**

Se tomaron muestras de sangre utilizando Na<sub>2</sub>EDTA como anticoagulante. Una alícuota de 0,5 ml. fue centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm, el plasma y la porción superior de los elementos formes fueron retirados. El pellet de glóbulos rojos (GR) remanentes fue lavado 4 veces con 3 ml de una solución de NaCl al 0,9 %, centrifugando por 10 minutos a 3000 rpm luego de cada lavado. Los GR lavados fueron lisados mediante el agregado de agua desionizada helada. El lisado de GR fue diluido 50 veces con buffer fosfato (pH 7; 0,01 mol/l) y la actividad de la enzima fue medido usando un Kit comercial (RAN-SOD, by RANDOX Laboratories). Los resultados fueron expresados en unidades internacionales por mililitro (UI/ml).

#### **Determinación de quimioluminiscencia (QL) en glóbulos rojos:**

La muestra de sangre fue centrifugada por 10 minutos a 1000 g y a 4 °C. El plasma y la porción superior de elementos formes fueron descartados. Los GR remanentes fueron lavados 3 veces en una solución salina bufferada (PBS 5mM pH 7,4; 150 mM NaCl). El estudio se realizó mediante un sistema *in vitro*, dependiendo de t-butyl hidroperóxido (tBH) (8 mM), en buffer 0,05 M fosfato pH 7,4 a 37 °C. De cada muestra se midió hemoglobina y se estandarizó al 1,5 %. El proceso fue cuantificado por emisión lumínica (18) en un contador de centelleo líquido Packard 1900 TR. La quimioluminiscencia fue determinada durante 60 minutos y cuantificada en cuentas

por minuto (cpm) cada 5 minutos. En todos los casos se realizó en forma simultánea un blanco sin tBH que fue considerado como nativo de cada una de las muestras.

**Determinación de la composición de ácidos grasos de glóbulos rojos:** Los lípidos de las membranas tanto nativas como peroxidadas en las distintas condiciones experimentales se extrajeron por el método de Folch y col. (19), con BHT al 0,01 % como antioxidante. Los ácidos grasos de las membranas se transmetilaron con trifluoruro de boro al 10% en metanol a 60 °C durante una hora y los esteres metílicos se analizaron en un cromatógrafo gaseoso GC-14 (Shimadzu). Los picos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de estándares de ácidos grasos.

#### **Determinación de daño en el ADN en leucocitos mediante el "ensayo cometa":**

La determinación del daño en el ADN en leucocitos se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por Picco (20) con pequeñas modificaciones. Una alícuota de 15 ml de cada muestra de sangre se separó inmediatamente después de la extracción y se almacenó en completa oscuridad y a 4 °C hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el Laboratorio los 15 ml de sangre se mezclaron con 75 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5 %, y se sembraron en un portaobjetos cubierto con agarosa de punto de fusión normal al 0,5 %. Se realizaron dos preparados por donante. Las células se lisaron con solución detergente (EDTA 100 mM, ClNa 2,5 M, Tris 10 mM, Triton X-100 al 1 % y DMSO al 10%) durante al menos 1 hora y se almacenaron hasta la electroforesis. Antes de la electroforesis, los preparados se equilibraron en solución alcalina (EDTA 1mM, OHNa 300 mM, pH>13) durante 20 minutos para la desespiralización del ADN. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 25 V y 300 mA. Inmediatamente después, los preparados se neutralizaron mediante tres lavados con buffer Tris pH 7,5 cada 5 minutos y agua destilada.

Los preparados se colorearon con una solución de SYBR Green I® (Molecular Probes) 1 / 1000 y se analizaron con un microscopio Olympus BX 40 provisto de lámpara de mercurio de alta presión de 100 W (USHIO USH 102 D). Se utilizó una cámara Sony CCD para capturar las imágenes y estas se guardaron y analizaron utilizando el software Image Pro Plus®. Las células se clasificaron en primera instancia como normales (con núcleo redondeado) o anormales (con algún grado de migración de ADN del núcleo). En un segundo paso, las células anormales se clasificaron en diferentes grados del 1 al 5. Finalmente el Índice de daño en el ADN se calculó aplicado el modelo descrito por Collins (21), donde la ausencia de

daño se expresa como 0, siendo 400 el máximo nivel de daño posible.

#### Análisis de los resultados:

Los resultados del ensayo A se evaluaron mediante el análisis de regresión y correlación, mientras que la comparación entre rangos de cupremia se realizó mediante el análisis de la varianza. Los resultados del ensayo B se evaluaron mediante un Análisis de Muestras Repetidas dentro del General Lineal Model del paquete estadístico SPSS 10.0. Se empleó un ANOVA Factorial Mixto o split-plot, utilizando al grupo de origen (GS y GNS) como Factor Inter-sujeto y al tiempo como Factor Intra-sujeto, representando los muestreos los niveles de este factor. Las diferencias entre medias dentro de los factores se establecieron por Comparaciones Múltiples. Los resultados del ensayo C se evaluaron mediante el análisis de varianza. En todos los casos se exigió una significación estadística del 5 % ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Ensayo A: Los resultados obtenidos al estudiar la relación existente entre cupremia y daño en el ADN en leucocitos de sangre periférica se presentan en la Tabla 1. En ella puede observarse que valores bajos de cupremia se corresponden con los máximos niveles de daño en el ADN.

El análisis de regresión y correlación reveló la existencia de una fuerte asociación, de tipo lineal (invertida) entre ambas variables ( $y = 0,0003x^3 - 0,0317x^2 + 0,7711x + 63,103$ ;  $R^2: 0,9014$ ;  $p < 0,01$ ). El análisis estadístico realizado para comparar los valores de daño en el ADN obtenidos en cada rango de cupremia, permitió establecer la existencia de 3 niveles de daño en el ADN, correspondientes a cupremias menores a 30

Tabla 1. Rangos de cupremia e índice de daño en el ADN en leucocitos de bovinos con diferentes niveles de cupremia.

Rango de cupremia ( $\mu\text{g/dl}$ )	N	Índice de daño
1-10	9	67,3 ( $\pm 14,21$ ) a
11-20	93	68,7 ( $\pm 17,40$ ) a
21-30	71	68,1 ( $\pm 17,33$ ) a
31-40	46	58,9 ( $\pm 10,23$ ) b
41-50	28	57,4 ( $\pm 12,40$ ) b
51-60	17	55,9 ( $\pm 10,85$ ) b
61-70	22	45,9 ( $\pm 16,16$ ) bc
70-80	18	51,7 ( $\pm 14,26$ ) bc

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre rangos de cupremia ( $p < 0,05$ ).

$\mu\text{g/dl}$  de Cu en plasma (máximo nivel de daño), cupremias entre 30 y 60  $\mu\text{g/dl}$  (nivel intermedio) y cupremias mayores a 60  $\mu\text{g/dl}$  (mínimo nivel de daño).

Ensayo B: La tabla 2 muestra los resultados obtenidos al evaluar el comportamiento de la actividad Cu/Zn-SOD durante el desarrollo de la carencia y la evolución de los niveles de cupremia. Como puede observarse, la disminución de las cupremias se acompañó de una disminución en la actividad de dicha enzima, pero dicha disminución solo fue significativa al final del ensayo, luego de tres meses de carencia y siendo los animales hipocuprémicos severos por al menos dos meses.

Ensayo C: Los resultados obtenidos al analizar el índice de peroxidación y la composición de ácidos grasos en glóbulos rojos de animales Cu-deficientes se presentan en las tablas 3 y 4. Previo a la realización de dichas determinaciones, el análisis de células con daño en el ADN realizado en las mismas muestras reveló un mayor número de células con daño en los animales hipocuprémicos con relación a los controles (frecuencia de daño: 0,196 vs 0,144;  $X^2 = 5,13$ ;  $p = 0,023$ ). El índice de peroxidación observado en glóbulos rojos de animales con y sin deficiencia (medido cada 5 minutos y hasta los 25 minutos), no arrojó diferencias significativas, solo pudiéndose observar una tendencia a un mayor nivel de peroxidación a los 5 minutos de iniciado el ensayo en los animales con deficiencia de Cu (85 vs 100 cpm en normo e hipocuprémicos respectivamente). La posterior determinación de la composición de ácidos grasos de membrana tampoco arrojó diferencias estadísticas significativas entre animales normales e hipocuprémicos cuando se analizó a cada ácido graso en particular. Sin embargo, el porcentaje de ácidos grasos saturados totales fue estadísticamente superior en los animales hipocuprémicos (72,9 % vs 64,1% en hipo y normocuprémicos respectivamente;  $p < 0,05$ ), al igual que la relación ácidos grasos saturados/insaturados ( $p < 0,05$ ). Mientras que el porcentaje de ácidos grasos insaturados totales fue mayor en los animales normocuprémicos (35,9 vs 27,06 %;  $p < 0,05$ ).

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente ensayo permiten observar en primer lugar una estrecha asociación entre el estatus de cobre de los animales (valorado según la cupremia) y los niveles de daño en el ADN. Dicha asociación, que se presenta como una correlación inversa entre cupremia y daño en el ADN, muestra que pequeñas variaciones en el estatus de Cu producen inmediatas consecuencias en la integridad del ADN, pero además permiten reconocer con claridad tres estratos de cupremia en los

Tabla 2. Concentración promedio de Cu ( $\pm$  ES) en plasma y actividad superóxido dismutasa eritrocitaria (SODe) en los grupos suplementado (A) y no suplementado (B).

	1° muestreo	2° muestreo	3° muestreo
<b>GRUPO A</b> <b>plasma (<math>\mu\text{g}/\text{dl}</math>)</b>	48 ( $\pm 12,24$ )a A	88 ( $\pm 4,40$ )a B	75 ( $\pm 4,9$ )a AB
<b>GRUPO B</b> <b>plasma (<math>\mu\text{g}/\text{dl}</math>)</b>	37 ( $\pm 8$ )a AB	51 ( $\pm 18,22$ )b A	30 ( $\pm 4,2$ )b AB
<b>GRUPO A</b> <b>SODe (UI/ml)</b>	376 ( $\pm 29,8$ )a A	358 ( $\pm 19,9$ )a A	383 ( $\pm 14,4$ )a A
<b>GRUPO B</b> <b>SODe (UI/ml)</b>	397 ( $\pm 30,9$ )a A	381 ( $\pm 30,6$ )a A	338 ( $\pm 11,3$ )b A

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre muestreos ( $p < 0.05$ ).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (%) en los eritrocitos de animales suplementados y no suplementados.

Ácido graso	Suplementados	No suplementados	Significación estadística
C16:0	36,79 ( $\pm 2,47$ )	37,87 ( $\pm 1,47$ )	0,79
C16:1	7,73 ( $\pm 2,61$ )	5,03 ( $\pm 0,56$ )	0,43
C18:0	27,13 ( $\pm 4,43$ )	35,06 ( $\pm 0,85$ )	0,19
C18:1	20,24 ( $\pm 1,54$ )	15,81 ( $\pm 1,41$ )	0,09
C18:2	4,13 ( $\pm 0,74$ )	3,70 ( $\pm 0,98$ )	0,74
C20:4	3,30 ( $\pm 1,69$ )	2,52 ( $\pm 0,21$ )	0,71
Saturados	64,11 ( $\pm 2,43$ )	72,93 ( $\pm 2,17$ )	0,049
Mono saturados	27,98 ( $\pm 3,69$ )	20,84 ( $\pm 1,20$ )	0,173
Poli insaturados	7,91 ( $\pm 2,12$ )	6,22 ( $\pm 1,16$ )	0,56
Total insaturados	35,89 ( $\pm 2,43$ )	27,06 ( $\pm 2,17$ )	0,049
Saturados/insaturados	1,83 ( $\pm 0,20$ )	2,75 ( $\pm 0,32$ )	0,049

cuales el nivel de daño en el ADN es alto (hasta 30  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de Cu en plasma), intermedio (30-60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) y bajo (más de 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ). Permitiendo por lo tanto, clasificar el estatus de Cu de los animales solo conociendo los valores de daño en el ADN. Esta última agrupación de las cupremias es coincidente con aquella propuesta por Suttle ya en 1983 (22) y reafirmada por Underwood y Suttle en 1999 (4) (Hipopupremia severa= menor a 30  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; hipocupremia moderada= entre 30 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; normocupremia= mayor a 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), con la salvedad que dichos autores sugieren la posibilidad de aparición de consecuencias de la enfermedad cuando el animal es hipocupremico severo, mientras que según nuestros resultados, considerando al daño en el ADN como una consecuencia de la enfermedad, las alteraciones provocadas por la deficiencia aparecen ni bien el animal deja de ser normocuprémico.

En cuanto al origen de dicho daño, hemos especulado recientemente con el posible origen

Tabla 4. Índice de peroxidación (cpm) en eritrocitos pertenecientes a animales de los grupos suplementado y no suplementados.

		Tiempo (minutos)					
		0	5	10	15	20	25
<b>Grupo A</b>	3,4	<b>85</b>	80	67	55	47	
<b>Grupo B</b>	5,5	<b>100</b>	90	71	57	47	

oxidativo, producto de las disminuciones en la actividad de enzimas antioxidantes Cu-dependientes (Cu/Zn-SOD y Cp) y Cu-influenciables (GSHpx y catalasas), concomitantes con un incremento potencial de la producción de especies activas del oxígeno en la cadena respiratoria por disfunción de la CCO. Dicho esquema de producción de daño oxidativo, desarrollado ampliamente por Strain (12) para explicar otras

consecuencias de la enfermedad, y apoyado a partir de la información proveniente de ensayos aislados o parciales, realizados mayoritariamente *in vitro* (2,13,14,15,16,20) permiten suponer que el dicho modelo de daño oxidativo podría explicar el origen del daño en el ADN observado en bovinos en condiciones naturales. Sin embargo, y en contraposición con dicho modelo en el cual se le asigna un rol preponderante a la disminución de la actividad de la Cu/Zn-SOD, las evidencias obtenidas en este trabajo sugieren que se requieren varios meses de carencia (y por ende de valores subnormales de cupremia) para que se afecte significativamente la actividad SOD, lo cual es coincidente con las observaciones realizadas previamente por Boyne y Arthur (23), para los cuales la actividad de dicha enzima solo se afectó tras un prolongado periodo de carencia y con valores correspondientes a hipocupremia severa. Pese a ello, los resultados obtenidos al evaluar la composición de ácidos grasos en las células de animales con y sin un adecuado estatus de Cu sugieren la alteración del estatus antioxidante a favor de una condición prooxidante durante la carencia de Cu. En dicho ensayo, concomitante con un incremento en la frecuencia de leucocitos con daño en el ADN, la composición de ácidos grasos en eritrocitos reveló un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados en aquellos animales Cu-deficientes. Simultáneamente, se observó una mayor tendencia a la peroxidación de ácidos grasos, lo cual es interesante ya que dada la composición de ácidos grasos mayoritariamente saturados, era esperable una menor capacidad de peroxidación, apoyando nuevamente la teoría del estrés oxidativo durante la deficiencia. En tal sentido, dado que la enzima CCO presenta un umbral de protección mucho menor, con afectación de su funcionamiento en bovinos cuando estos dejan de ser normocuprémicos, es probable que presente un rol central en la génesis de dicho daño (20). Otra enzima que podría tener un rol clave es la Cp, la cual al igual que la CCO presenta una inmediata disminución en su actividad cuando disminuye la cupremia. De hecho, la actividad antioxidante ferroxidasa de dicha enzima posee una correlación mayor al 93% con la concentración plasmática de Cu (24). Estudios realizados en individuos aceruloplasminémicos demuestran que la falta de actividad Cp conduce a una acumulación intracelular de hierro y a un incremento de alteraciones oxidativas (20). Por otra parte, estudios realizados por este grupo demostraron que durante la deficiencia de Cu se produce un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (10) y que en la génesis de dicho daño intervienen no solo una lesión en el ADN, sino también una incapacidad relativa para reparar dicho daño, específicamente una incapacidad de reparación del ADN en el período

G<sub>2</sub> del ciclo celular (25). Dicha observación sugiere un segundo factor posible para explicar la aparición de alteraciones en la molécula de ADN, pero de ninguna manera puede excluir la teoría del daño oxidativo, ya que Según Guetens y col. (26) el principal efecto pernicioso del incremento de la concentración de EAO es ejercido sobre las proteínas, agregando que las enzimas de la reparación no se encuentran exentas. Concluyen además que el hecho de que normalmente puedan detectarse productos de la oxidación de bases nitrogenadas indicaría que en condiciones *in vivo*, dichas enzimas se hallan muy cerca de su capacidad máxima de respuesta.

Por lo tanto, la deficiencia de Cu en bovinos provoca la producción precoz de daño en la molécula de ADN, participando probablemente en la génesis de dicho daño la alteración de la capacidad orgánica antioxidante. Sin embargo futuros estudios deberán orientarse a establecer el origen mono o multifactorial del daño en el ADN, así como su impacto en la capacidad productiva, reproductiva e inmunológica durante la hipocuprosis bovina.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ramírez CE, Mattioli GA, Tittarelli CM, Giuliodori MJ, Yano H. Cattle hypocuprosis in Argentina Associated with periodically flooded soils. *Livestock Production Science* 55, pp: 47-52. 1998.
2. Fazzio LE. Caracterización de terneros de cría con hipocuprosis. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2006.
3. Mattioli GA. Caracterización de la hipocuprosis bovina en el Partido de Magdalena (Provincia de Buenos Aires). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 1998.
4. Underwood EJ, Suttle NF. *The mineral nutrition of livestock*. 3<sup>rd</sup> edition. CABI Publishing. 1999.
5. Tessman RK, Lakritz J, Tyler JW, Casteel SW, Williams JE, Dew RK. Sensitivity and specificity of serum copper determination for detection of copper deficiency in feeder calves. *J Am Vet Med Assoc* 218 (5): 756-60. 2001.
6. Pan Y, Loo G. Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Rad. Biol. & Med.* 28 : 824-30. 2000.
7. Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Modulation by dietary copper of aflatoxin B1-induced activity of DNA repair enzymes poly (ADP-ribose) polymerase beta and ADN ligase. *In Vivo* 10: 533-536, 1996.
8. Percival SS. Copper and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (suppl), 1064s-1068s. 1998.
9. Picco SJ, De Luca JC, Mattioli G, Dulout FN. DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the comet assay. *Mutation Research* 498: 1-6, 2001.
10. Picco SJ, Mattioli GA, Fazzio LE, Rosa D, De Luca JC, Dulout FN. Association between copper plasma

- level and DNA damage in cattle. *Mutagenesis* 19 (6), 453-456, 2004.
11. Abba MC, De Luca JC, Mattioli G, Zaccardi A, Dulout FN. Clastogenic Effect of copper deficiency in cattle. *Mutation Research* 466. pp. 51-55. Abba, M.C., J.C. De Luca, G. Mattioli, E. Zaccardi, F.N. Dulout. 2000. Clastogenic Effect of copper deficiency in cattle. *Mutation Research* 466. pp. 51-55, 2000.
12. Strain JJ. Newer aspects of micronutrients in chronic disease: Copper. *Proceeding of the Nutrition Society*, 53: 583-598, 1994.
13. Prohaska JR. Biochemical change in copper deficiency. *J Nutr Biochem.* 1: 452-461. 1990.
14. Sukalsky KA, LaBerge TP, Johnson WT. In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free. Radic. Biol. Med.* 22 : 835-842, 1997.
15. Cockel KA, Belonje B. The carbonyl content of specific plasma proteins is decreased by dietary copper deficiency in rats. *J Nutr.* 132: 2514-2518, 2002.
16. Hawk SN, Lanoue L, Keen CL, Kwik-Urbe CL, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Copper-deficient rat embryos are characterised by low superoxide dismutase activity and elevated superoxide anions. *Biol. Reprod.* 68 : 896-903, 2003.
17. Piper HG, Higgings G. Estimation of trace metals in biological material by atomic absorption spectrophotometry, *Proc. Assoc. Clin. Biochem.* 7 190-195, 1967.
18. Rosa D, Catala A. Fatty acid profiles and non enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from bovine liver, kidney, lung and heart. *Archives of Physiology and Biochemistry* 1998, 106: 1-5, 1998.
19. Folch J, Lees N, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
20. Picco SJ. Consecuencias genotóxicas y clastogénicas en bovinos hipocupremicos [tesis doctoral] Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2004.
21. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Mol Biotech* 26: 249-261, 2004.
22. Suttle NF. The nutritional basis for trace element deficiencies in ruminant livestock. En *Trace elements in animals productions and veterinary practice.* Occ. publication N° 7 - British Society of Animal Production. Edit: Suttle, N. F., Gunn, R. G., Allen, W. M., Linklater, K. A. and Wiener G. 2.1: 19-25, 1983.
23. Boyne R, Arthur JR. Effects of molybdenum or iron induced copper deficiency on the viability and function of neutrophils from cattle. *Research in Veterinary Science* 41, 417-419, 1986.
24. Bingley JB, Anderson N. Clinically silent hypocuprosis and the effect of molybdenum loading on beef calves in Gippsland, Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* 23, 885-904, 1972.
25. Picco SJ, Mattioli GA, Fazzio LE, Rosa DE, De Luca JC, Dulout FN. Effect of 3-aminobenzamide on lymphocytes of copper-deficient cattle. *Journal of Basic and Applied Genetics* XVI (1/2), 13-18, 2004.
26. Guetens G, De Boeck G, Highley M, van Oosterom AT, de Bruijn EA. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 39: 331-457, 2002.