

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

¹ Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Tel/Fax 03783–430101, Int. 150, E-mail: fisbiol@vet.unne.edu.ar

² Centro Atómico de Ezeiza, División Agropecuaria, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Buenos Aires.

Resumen

Brem, J.J.; Mestre, J.; Pochon, D.O. y Trulls, H.E.: Alteraciones del ciclo estral provocadas por un alto ingreso de molibdeno en vaquillonas Brangus y respuesta a la suplementación con cobre. 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 oxidasa 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 ¹²⁵I 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 suplementado 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 ^{11–14, 21}. Asimismo, en bovinos suplementados con cobre se observaron mayores números de celos, mejores tasas de servicio por concep-

ción y elevación en los porcentajes de preñez entre el 10 al 27% según categorías ^{10, 14, 22}. 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 ^{9, 20, 23}. 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 ^{1, 2, 18, 19}. 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.

* Trabajo realizado en el Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias de Formosa (CEDIVEF), con subsidios otorgados por CONICET.

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^R). 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 ^{125}I 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 fotocolorimétrico de la cian–meta–hemoglobina 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 ⁷, 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 ⁸.

Las lecturas fotocoloriméricas fueron efectuadas en un espectrofotómetro Coleman Perkin–Elmer 55–B, provisto de microcubeta con vaciado automático. La medición radiactiva del ^{125}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. La pruebas de comparaciones

múltiples fueron realizadas mediante contrastes ortogonales por el método de Scheffé.

Para la variable cobre hepático, el análisis de la variancia se realizó bajo un diseño en bloques completamente 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 presentaron 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 ⁴⁻⁶.

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 ¹⁵. 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 fotocolorimétrico 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 pre-

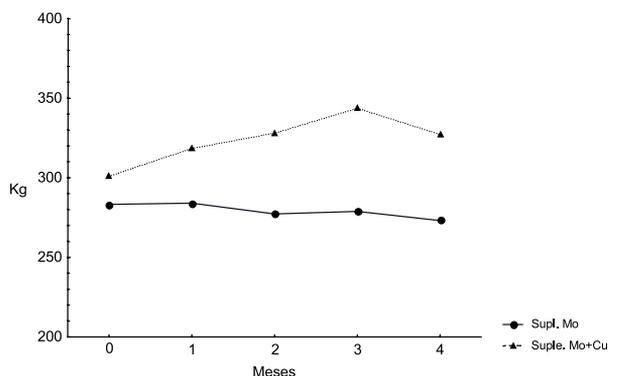


Figura 1. Evolución del peso corporal. Las diferencias entre tratamientos fueron significativas ($p < 0,05$) y se iniciaron en el segundo mes del ensayo.

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.

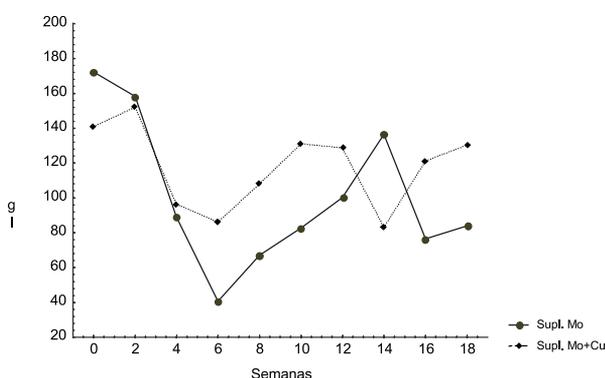
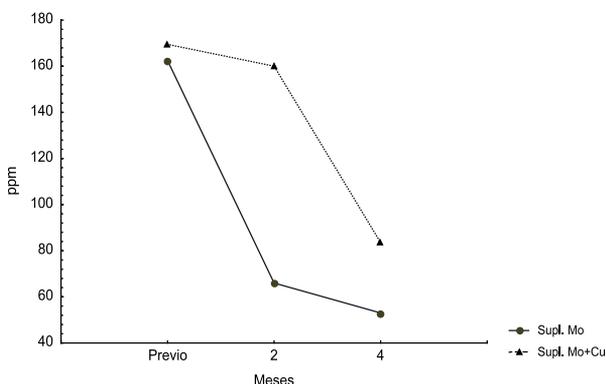
semanas	promedio		I.C. <95 %		I.C. >95 %		desvío estándar	
	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo	Mo	Cu+Mo
previo	14,57	14,49	13,34	13,54	15,79	15,44	0,99	0,76
2	13,34	13,59	12,30	12,93	14,37	14,25	0,83	0,53
4	12,47	12,82	11,74	11,50	13,20	14,13	0,59	1,06
6	13,98	14,71	13,07	13,05	14,88	16,38	0,73	1,34
8	14,35	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

sentes 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^{16,17}. 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 tetratiomolibdatos³.

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

**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 ($p < 0,05$).

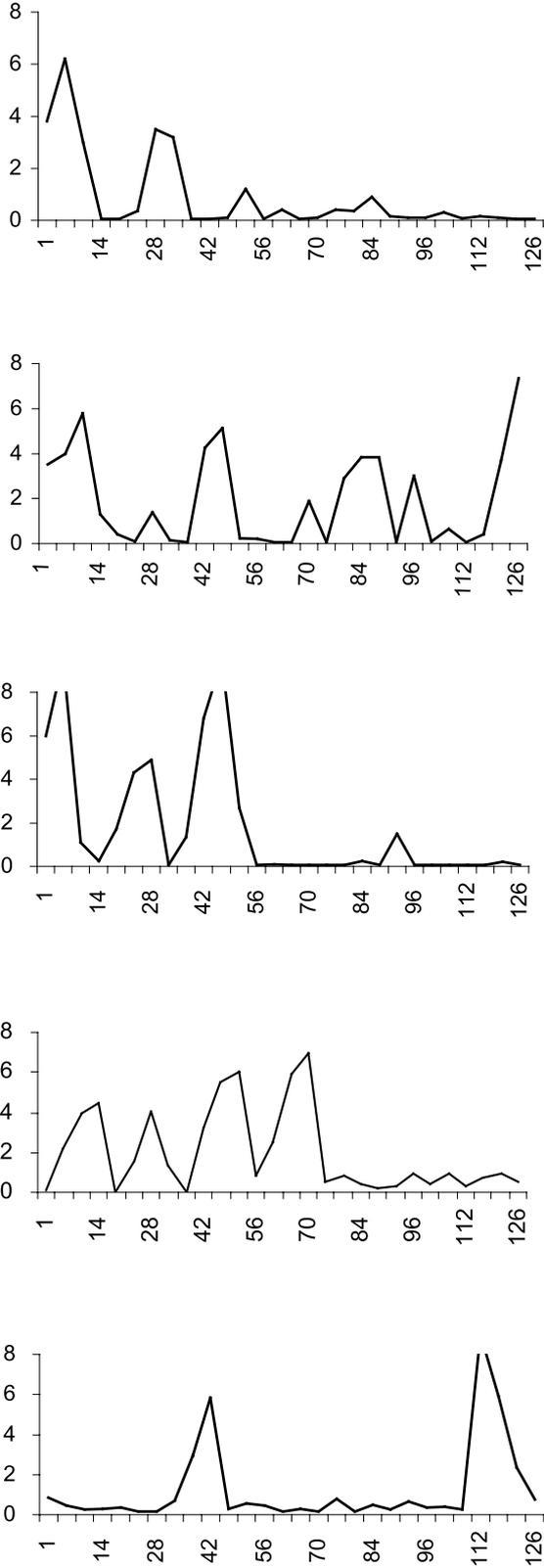


Figura 4: Comportamiento de la progesteronemia en animales del lote que solo recibió Mo.

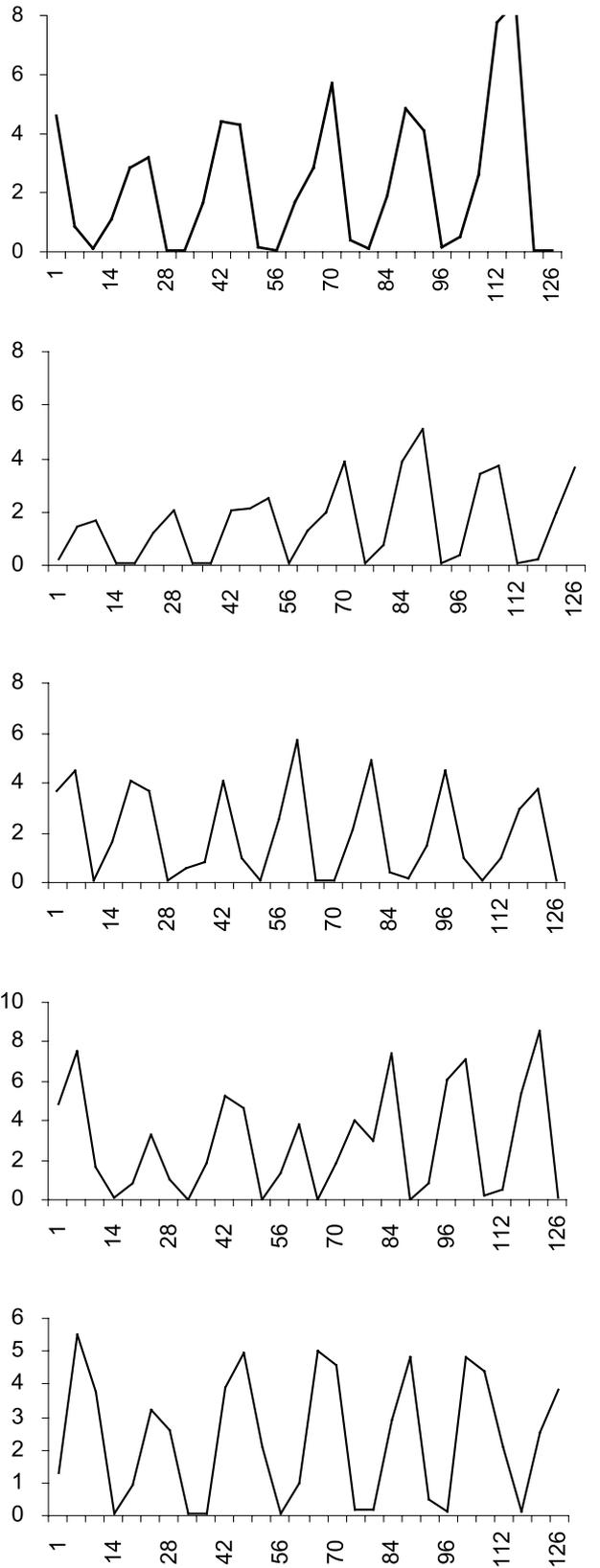


Figura 5: Comportamiento de la progesteronemia en animales que recibieron Mo más suplementación con Cu.

Ordenadas: concentraciones hormonales (ng/ml). Abscisas: 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 %		desvío 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

en plasma¹⁵. También se registraron incrementos de los episodios de liberación de LH, que aumentaron el crecimiento folicular culminando con el restablecimiento del ciclo ovárico normal¹⁹. 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.

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.

Abstract

Brem, J.J.; Mestre, J.; Pochon, D.O. y Trulls, H.E.: *Alteration of the estral cycle in Brangus heifers due to high intake of molybdenum. Response to the supplementation with copper.* Causes of reproductive alterations associated to primary and secondary copper deficiencies in heifers are controversial. In copper secondary deficiency associated to molybdenum intake, hypophyseal and ovarian hormones imbalances are related to molybdenum action rather than the organic copper levels. The aim of this work was to associate the evolution of the estral cycle of heifers with different supplementation protocols of copper and molybdenum. For this purpose, ten Brangus heifers (3/4 A. Angus 1/4 Brahman), 3 years old, with regular estrus cycle and without previous mating were used. Two lots of 5

animals each were orally treated with 1100 mg Mo/day (molybdenum heptamolybdate) for 126 days. A similar situation occurs when animals are fed on natural grass with 40 – 50 ppm molybdenum dry matter. Additionally, one of the lots received a single copper dose (0.5 mg/kg SC) on the first day of the assay. Copper levels were estimated by means of oxidase ceruloplasmin and hepatic and hematic concentrations. Hypocuprosis was detected in the lot that only received Mo, while this did not happen in the Cu supplemented lot. RIA of ¹²⁵I progesterone was used to analyze the hormone hematic levels during the 6 expected estral cycles. Three animals with molybdenosis had anoestrus from the middle of the assay, while the others had irregular cycles. On the contrary, lot with excess of Mo, but supplemented with Cu, had normal cycles. Statistical analysis of the total of heats in both treatments showed a $\chi^2 = 21.82$ ($p < 0.01$). We conclude that the excess of Mo significantly affected the ovary activity, and that the supplementation with Cu helped animals to maintain normal estral cycles during the assay. This indicates that there was not a direct action of the excess of molybdenum on the ovarian activity, and that the alterations were attributable to the secondary copper deficiency due to molybdenosis.

Key words: bovine, reproduction, estral cycle, molybdenosis, copper.

REFERENCIAS

1. **Auza N.** 1983. Le cuivre chez les ruminants. Une revue. *Ann. Rech. Vét.* 14: 21–37.
2. **Auza N, Acuña C, Casaro JP, Braun JP.** 1983. Effects de l'administration de diverses préparations chez de bovis carences en cuivre. *Biologie Prospective. 5 Colloque International de Pont. a. Mousson.* Masson ed., p. 1145–1147.
3. **Ayiannidis A, Giroussi S, Oulgaropoulos A.** 1996. Aspects 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.
4. **Brem JJ, Roux JP.** 1987. Haematological aspects in experimental bovine molibdenosis with and without parenterally

- copper treatment. *First Congress of Toxicology in developing Countries*, Buenos Aires, p. 23.
5. **Brem JJ, Roux JP.** 1991. Aspectos clínico hematológicos de la molibdenosis experimental en bovinos con y sin tratamiento parenteral de cobre. *Vet. Arg.* 8: 38–49.
 6. **Brem JJ, Pochon DO, Roux JP, Mussart de Coppo NB.** 1991. Estudios ferrocínéticos en ovinos sometidos experimentalmente a un exceso de molibdeno. *Rev. Med. Vet.* 72 : 229–239.
 7. **Carrillo BJ, Bingley JB.** 1964. Técnica de biopsia de hígado y análisis de la muestra. *RLA* 1: 103–118.
 8. **Eden A, Green HH.** 1940. Microdetermination of copper in biological material. *Biochem. J.* 34: 1202–1208.
 9. **Engel RW, Hardinson WA, Miller RE, 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.
 10. **Farina JN, Farina JL, Farina CM.** 1983. El desbalance mineral como causa de bajos porcentajes de preñez. *Gac. Vet.* 45: 653–656.
 11. **Ferrando R.** 1971. Les besoins en oligoelements des animaux domestiques et les conséquences de leur carence. *Ann. Nutr. Alim.* 25: 231–235.
 12. **Gonzalez GD, Capaul EG, Silva JH.** 1980. Hacienda de cría: estudio de algunos parámetros hemáticos en rodeos problemas. I: Casuística. *Resúmenes del III Congreso Argentino de Cs. Vet.*, Buenos Aires, p. 251.
 13. **Hidiroglou M.** 1973. Trace element deficiencies and fertility in ruminants: A review. *J. Dairy Sci.* 62: 1195–1206.
 14. **Hunter AP.** 1977. Some nutritional factors affecting the fertility of dairy cattle. *New Zealand Vet. J.* 25: 305–308.
 15. **Lannon B, Mason J.** 1986. The inhibition of bovine ceruloplasmin oxidase activity by thiomolybdates *in vivo* and *in vitro*: a reversible interaction. *J. Inorg. Biochem.* 26: 107–115.
 16. **Mason J, Kelleher CA, Letters J.** 1982. The demonstration of protein-bound 99Mo-di and trithiomolybdate in sheep plasma after the infusion of 99Mo-labelled molybdate into the rumen. *Br. J. Nutr.* 48: 391–397.
 17. **Norheim G, Soli NE, Froslic 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.
 18. **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.
 19. **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.
 20. **Poole DBR, Walshe MJ.** 1978. Mechanism of the molybdenum/sulphur 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 infertility 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.