

Aplicación de otras técnicas de observaciones histológicas del tegumento bovino deficiente en cobre

María Del Carmen Bisio *

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es comprender e interpretar la histología del tejido tegumentario en bovinos normocuprémicos e hipocuprémicos, a través del Microscopio Óptico Común (MOC) y el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). Se debe destacar que cada día se incorporan nuevos aportes científicos sobre los elementos trazas, no sólo en bovinos sino en otras especies. Se emplearon cuarenta bovinos; raza: Hereford, novillos machos, peso promedio: 230 kg, procedencia: dos campos (Provincia de Buenos Aires); con carencia en cobre y otros sin ella de ambos campos; fueron agrupados en dos lotes con igual número: A. Campo con deficiencias y B: Campo óptimo. Para estudio histológico, se tomaron muestras del tegumento del pabellón auricular de los dos lotes, se fijaron con formol bufferado al 10% a pH 7,4 continuándose con las técnicas para el (MOC) y para el (SEM), el muestreo, se fijó de la misma forma que para el (MOC), cortes de 20 y 40 micras. Se obtuvo de ambos lotes muestras de sangre, extraídas de la yugular, para determinación de

cobre (Cupremia) por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS), los que determinaron para el lote A niveles medios inferiores a 0,50 mcg/dl de Cu resultaron que eran hipocuprémicos, en tanto el Lote B, valores medios de 0,70 mcg/dl de Cu. Se concluyó que sí existe la posibilidad de comparar y correlacionar las observaciones de las alteraciones morfológicas descritas en el Microscopio Óptico Común (MOC) como en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM); permitiendo la interpretación de estructuras normales de las patológicas; ambas técnicas y microscopios son de utilidad para esta evaluación.

Palabras clave: bovinos, cobre, microscopios, observaciones, técnicas.

* Médica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Departamento de Fisiología y Ciencias Básicas. Área de Histología y Embriología. Chorroarín 280 (1427) Ciudad de Buenos Aires, República Argentina. Correo electrónico: mcbisio@fvvet.uba.ar
Fecha de recepción: diciembre 21 de 2005.
Fecha de aprobación: febrero 13 de 2006.

APPLICATION OF OTHER HISTOLOGICAL TECHNIQUE OBSERVATIONS OF BOVINE TEGUMENT WITH CUPPER DEFICIENCY

ABSTRACT

The objective of this paper was to understand the histology of bovine teguments with normal and low copper levels by Common Optical Microscope (COM) and Scanning Electronic Microscope (SEM) observations. It is worthwhile noting that new scientific findings about the importance of trace elements are reported not only for bovines but also for other species. Forty Hereford steers, average live weight 230 kg from two fields of the Buenos Aires Province with low levels of copper were used. The animals were distributed in two groups A and B with the same number of animals: group A with Cu deficiency, group B with optimal Cu levels. For the histological study, samples of teguments of the auricular pavilion from the two groups of animals were fixed with buffered formol 10%, pH 7.4. The samples for MOC and SEM observation were cutted in 20 and 40 micrometers. Blood samples were

extracted from the jugular for Cu determination by Spectrophometer of atomic absorption. Results: group A showed mean values lower than 0,50mcg/dl (hypocupremia). Group B mean values of 0,70mcg/dl (normocupremic). We concluded that it is possible to compare and make correlations of the morphological alterations observed by the MOC and SEM. Both techniques and microscopes were useful to distinguish the normal structures from those with copper deficiencies.

Key Words: bovines, copper, microscope, observations, techniques.

INTRODUCCIÓN

La importancia del cobre en la alimentación la observaron Hart *et al.* (1928), su necesidad conjuntamente con el hierro para prevenir anemias en las ratas (Hart, 1928); determinaron en la Universidad de Wisconsin la necesidad de cantidades pequeñas de cobre y de hierro conjuntamente, para que se forme la hemoglobina si bien el cobre no es un elemento inorgánico de ella, si se halla como hemocuperina en las células animales; en ciertos invertebrados se encuentra como hemocianina, teniendo como función el transporte de oxígeno. *A posteriori* se observaron diferentes patologías debidas a la deficiencia de cobre, tales como ataxia enzoótica en ovinos, miocarditis en bovinos, enfermedades vasculares en aves y cerdos. (Bennets, 1937, 1939).

En las ratas se observó notoria disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa y así se empezó a saber la actividad catalítica que tiene (Cohen, 1934). Se aisló su metalo-proteína en la década de 1930 (Mann, 1934), pero tuvieron que pasar más de 30 años para comprobarse que tenía una importante actividad enzimática, pues se trata de una superóxido dismutasa; existiendo otras como la lisil oxidasa, catalizando las uniones cruzadas de colágeno y elastina en la matriz extracelular del tejido conectivo (O' Dell, 1961), los animales con deficiencias o mutaciones genéticas disminuyen la actividad de aquellas enzimas.

Otras enzimas como la tirosinasa presentan una función catalítica importante, como es la formación de melanina cuyo efecto patológico es la falta de pigmentación, generando el abayamiento o manto descolorido muy notorio en la raza Aberdeen Angus y en los Hereford. En tanto la ceruloplasmina cataliza la ferroxidasa, amina-oxidasa produciendo alteraciones metabólicas del hierro y consecuentemente anemias. (Cousins, 1985; Hsieh, 1975).

El cobre es transportado por la ceruloplasmina-oxidasa desde su reservorio el hígado hacia los distintos tejidos para sintetizar cuproenzimas; tal el caso de la citocromo c oxidasa, lisil oxidasa y superóxido dismutasa (McCord, 1969; Mills, 1976); aún se desconoce el pasaje por el cual el cobre de la ceruloplasmina se dirige hacia las células; pero considerando que esta enzima es donadora directa de este microelemento, podría pensarse en la existencia de receptores de superficie de membranas de las células (Hsieh, 1975).

Una prueba que determinó cuán es de esencial el cobre en el hombre, fue la enfermedad de Menkes, alteración genética que provoca trastornos en los procesos de absorción y metabólicos; patología similar a la del ratón moteado mutante. (Danks, 1988; Hunt, 1974; Hurley, 1975).

Según Davis *et al.* (1986) y Mason (1979), a nivel del tubo digestivo que va desde el estómago al colon, dependiendo de las especies el principal punto de absorción del cobre sería el duodeno; sin saberse aún cual es el mecanismo preciso con la probabilidad que su regulación esté dada por la misma mucosa intestinal. Por lo anterior, se le ha dado importancia desde el punto de vista molecular a la metalo-tioneína referencia observada por Cousins (1985) (Cousins, 1985; Danks, 1988; Davis, 1986; Shields, 1962).

Recientes investigaciones a través de estudios en Biología Molecular, especifican que el cobre actuaría como coenzima sobre determinados receptores de las células, en la participación sobre el proceso de mielinización del sistema nervioso; al igual que condiciona desarrollo y crecimiento del sistema óseo, estimulando producción de colágeno sobre la actividad de la fosfatasa alcalina y actúa evitando la formación de excrecencias cartilaginosas en el nudo y tarso, haciendo resistente el hueso a las fracturas (O' Dell, 1961). Lo expuesto anteriormente explica

lo que denomina ataxia, esto se observa en terneros y becerros, cuyas necropsias revelan lesiones en el sistema nervioso periférico; consecuencia a madres carenciadas en cobre durante la gestación.

En cuanto a las alteraciones óseas en animales deficientes, es debido a dos parámetros importantes: disminuye la actividad de los osteoblastos y consecuentemente retardando que se forme la matriz ósea, y además provoca baja actividad de la lisil-oxidasa, causando disminución de la resistencia ósea, afectando como ya se mencionó, al colágeno por disminuir el entrecruzamiento fibrilar; también afecta a la elastina, la cula cuando se reduce en su formación, puede causar ruptura de vasos sanguíneos hasta el grado de ocasionar aneurismas (Harris, 1974; O' Dell, 1961; Starger, 1975).

Los avances de la ciencia sobre los elementos trazas a través del tiempo, conducen a no sólo quedarse con las sintomatologías observadas macroscópicamente que producen tanto las carencias como las deficiencias; sino que se debe profundizar y complementar estos estudios por métodos: bioquímicos (análisis de sangre), fisiológicos, biogeográficos, histológicos (no solamente con las técnicas rutinarias para el MOC, sino coadyuvarlas con el SEM.

Este trabajo tiene como objetivo, interpretar la histología del tejido tegumentario en bovinos normocuprémicos e hipocuprémicos, a través del MOC y el SEM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con cuarenta bovinos procedentes de dos campos de la Provincia de Buenos Aires; uno con carencia de cobre y otro sin ella. Se estandarizaron:

raza: Hereford, sexo: machos, tipo de animal: novillos y peso: media = 230 kg. Los animales por estudios biogeográficos de ambos campos fueron agrupados en dos lotes: A. Campo bajo y B. Campo óptimo alto. Logrando en A 20 bovinos hipocuprémicos y B con igual cantidad de animales normocuprémicos.

Se obtuvieron de ambos lotes muestras de sangre extraídas de la yugular, para la determinación de los valores de cobre (cupremia), por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS), los cuales determinaron para el lote A niveles medios inferiores a 0,50 mcg/dl de Cu resultando hipocuprémicos, en tanto el lote B presentó valores medios de 0,70 mcg/dl de Cu.

Para el estudio histológico, se tomaron muestras de tejido tegumentario del pabellón auricular de los dos lotes, se fijaron con formol bufferado al 10% a pH 7,4. En el procesamiento para el MOC se efectuaron cortes de 4 micras con micrótomo de deslizamiento de cuchillas descartables, empleándose las técnicas convencionales de tinción: Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Golden Masson. Se tomaron microfotografías con microscopio marca Zeiss a 25X y 45X.

El muestreo para el SEM se fijó de la misma forma que para el MOC; cuyos cortes fueron de 20 y 40 micras, con el mismo micrótomo utilizado anteriormente. Éstos fueron adheridos con esmalte de uñas a papel aluminio, previamente tratado con lavados sucesivos de agua destilada y acetona 50. (Figuras 1 y 2). Luego se procedió a su montaje en soportes para microscopía electrónica de barrido, para ser sombreados con oro-paladium y observados al MEB, marca JOEL-LSM, microfotografiadas a 1200X.

FIGURA 1. MONTAJE SOBRE PAPEL DE ALUMINIO (A), DEL CORTE GRUESO INCLUIDO EN PARAFINA (P), DE 20 MICRAS DE ESPESOR. SIN RESULTADOS POSITIVOS PARA EL SEM.



FIGURA 2. MONTAJE SOBRE PAPEL DE ALUMINIO (A) DEL CORTE GRUESO INCLUIDO EN PARAFINA (P), DE 40 MICRAS DE ESPESOR. RESULTADOS FAVORABLES PARA LA OBSERVACIÓN AL SEM.



RESULTADOS

Los resultados observados en el lote A en el MOC fueron: en la epidermis y folículos pilosos, disminución de melanina; en la dermis el epitelio de las glándulas sudoríparas, pasó de cúbico simple a casi plano simple, tanto a nivel adenomérico como en su sistema de conducción; las glándulas sebáceas presentaron alteraciones citológicas en sus células generatrices y cierta desorganización central hacia el sistema de conducción de secreción (Figura 3).

Al SEM a 20 micras los resultados son confusos; no es así a 40 micras: donde corrobora las mismas modificaciones histológicas halladas al MOC (Figura 4). Para el lote B la morfología fue normal tanto la observada en el MOC (Figura 5) como en el SEM (Figura 6).

FIGURA 3. TEGUMENTO DE BOVINO DEFICIENTE.

EPITELIO (EP) CON Poca QUERATINA Y ESCASA MELANINA (ME) AL IGUAL QUE EN CORTE DE FOLÍCULO PILOSO (FP), LAS GLÁNDULAS SEBÁCEAS (GSE), ALTERACIONES CITOLÓGICAS EN LAS CÉLULAS PERIFÉRICAS Y CENTRALES. OBSERVADOS AL MOC A 25X, H/E.

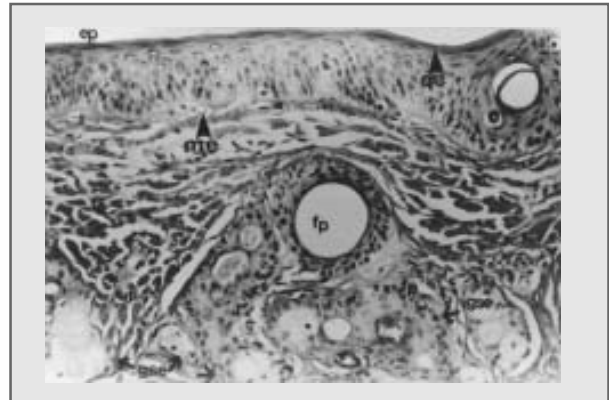
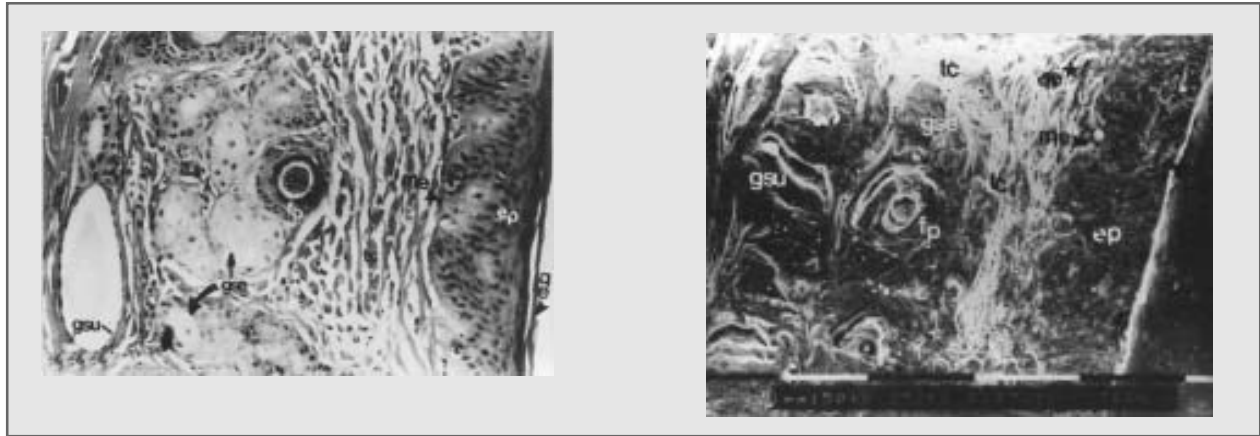


FIGURA 4. TEGUMENTO DE BOVINO DEFICIENTE. SE COTEJA LO OBSERVADO EN LA FIGURA 3: EL EPITELIO (EP) Y FOLÍCULO PILOSO (FP). AL MOC A 25X. H/ E. SE COTEJA LA MISMA FIGURA A TRAVÉS DEL SEM, OBSERVADA A 12000X.



FIGURAS 5 Y 6. EN LA 5 SE OBSERVA EPITELIO (EP), FOLÍCULO PILOSO (FP), MELANINA (ME), QUERATINA (Q), ABUNDANTES PARA AMBAS ESTRUCTURAS. LAS GLÁNDULAS SEBÁCEAS (GC), CON ASPECTO NORMAL ARRACIMADO Y LAS GLÁNDULAS SUDORÍPARAS (GSU) DEMUESTRAN UN EPITELIO NORMAL. EN LA 6, SE OBSERVA CORTE GRUESO PARA SEM, A 12000X, SIENDO LA MORFOLOGÍA, NORMAL EN AMBAS FIGURAS.



DISCUSIÓN

Actualmente no se puede hablar de una sola deficiencia de un determinado oligoelemento, ya que todos actúan en forma conjunta manejados por diferentes factores intrínsecos como extrínsecos, pero en este estudio se hace referencia al cobre sin ahondar en lo anteriormente dicho.

Los perjuicios de esta deficiencia con respecto a su sintomatología son en la ganadería muy variables, dependiendo de su hábitat geoecológico y tipo de alimentación. Esto último explica por qué en el forraje que se les suministra es importante la no interferencia de otros oligoelementos y las características edafológicas, ya que puede producir formación de complejos disminuyendo la disponibilidad de los mismos para el consumo apropiado de los animales (Suttle, 1975).

El abayamiento es uno de los síntomas más notorios, especialmente en los Aberdeen Angus y en menor grado en los Hereford, debido a la disminución de tirosinasa que al estar disminuida su actividad, incide en la síntesis de melanina. Otra manifestación es la presencia de zonas alopécicas (habiendo sido descartada la presencia de ácaros de la sarna), probable

causal de alteraciones citológicas de las glándulas en la dermis tegumentaria (Bisio, 1992) (Figuras 7 y 8).

En todo estudio es importante no sólo la recopilación de datos bibliográficos que se incorporan como herramienta fundamental al conocimiento para el logro de un proyecto y aceptar lo observable macroscópicamente, sino también profundizar y llegar a la observación microscópica, y detenerse a relacionar las morfologías celulares normales de las que no lo son así. Primero comenzando con observaciones al MOC y continuando con las del SEM, a la vez que se cotejan dos observaciones empleando técnicas similares, pero diferentes microscopios para hacer una interpretación de los resultados obtenidos.

CONCLUSIÓN

La conclusión es que existe la posibilidad de comparar y correlacionar las observaciones de las alteraciones morfológicas descritas en el Microscopio Óptico Común (MOC) como en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), permitiendo la interpretación de las estructuras normales de las patológicas. Pudiendo concluir diciendo que ambas técnicas y microscopios son de utilidad para esta evaluación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Liliana Delia Bisio, por su enorme apoyo moral y espiritual en la iniciativa de este trabajo.

A INTA Castelar – CICVyA Instituto de Patobiología.

Al Laboratorio de Rumen, MSc Cristina Arakaki.

Al Área Epidemiología: Sta. Cristina Soto.

BIBLIOGRAFÍA

- Bennetts, H. y Chapman, F. «Copper deficiency in sheeps in Western Australia: a preliminary account of the aetiology of enzootic ataxia of lambs and anemia of ewes». *Aust. Vet. J.* 13 (1937): 138-139.
- Bennetts, H. y Hall, H. «Falling disease of cattle in the southwest of Western Australia». *Aust. Vet. J.* 15 (1939): 152-159.
- Bisio, M.; Torrent, J. y Von Lawzewitsch, I. «Modificaciones histológicas en tejido tegumentario de bovinos, con deficiencia de cobre». *Rev. de Medicina Veterinaria* 73 5 (1992): 248-251.
- Cohen, E. y Elvehjem, C. «The relation iron and copper to the cytochrome and oxidase content of animal tissue». *J. Biol. Chem.* 107 (1934): 97-105.
- Cousins, R. «Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallo-thionein and ceruloplasmin». *Physiol. Rev.* 65 (1985): 238-309.
- Danks, D. «Copper deficiency in humans». *Annu. Rev. Nutr.* 8 (1988): 235-237.
- . -. et al. «Menkes' kinky hairs syndrome: an inherited defect in copper absorption with widespread effects». *Pediatrics* 50 (1972): 188-201.
- Davis, G. y Mertz, W. «Copper». *Trace Elements in Human and Animal Nutrition 5* (W. Mertz, ed.) Nueva York, Academic Press (1986): 301-304.
- Hart, E.; Steenbock, H.; Waddell, J. y Elvehjem, C. «Iron and nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat». *J. Biol. Chem.* 77 (1928): 797-812.
- Harris, E.; Gonnerman, W.; Savage, J. y O'Dell, B. «Connective tissue amine oxidase. II. Purification and partial characterization of lysyl oxidase from chick aorta». *Biochim. Biophys.* (1974): 341-332-344.
- Hunt, D. M. «Primary defect in copper transport underlies mottled mutants in the mouse». *Nature* 249 (1974): 852-854.
- Hurley, L. y Bell, L. «Amelioration by copper supplementation of mutant gene effect in the crinkled mouse». *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 149 (1975): 830-834.
- Hsieh, H. y Frieden, E. «Evidence for ceruloplasmin as a transport protein». *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 67 (1975): 1326-1330.
- Mann, T. y Keilin, D. «Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals». *Proc. r. Soc. Lond. Biol.* 126 (1939): 303-315.

- McCord, J. y Fridovich, I. «Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)». *J. Biol. Chem.* 255 (1969): 6049-6055.
- Mills, C.; Dalgarno, A. y Wenham, G. «Biochemical and Patological changes in tissues of Friesian cattle during the experimental induction of copper deficiency». *Brit. J. Nutrition* 35 (1976): 309-331.
- O'Dell, B.; Hardwick, B.; Reynolds, G. y Savage, J. «Connective tissue defect in the chick resulting from copper deficiency». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108 (1961): 402-405.
- Shields, G.; Coulson, W.; Kimball, D.; Carnes, W.; Cartwright, G. y Wintrobe, M. «Studies on copper metabolism». *Am. J. Pathol.* 41 (1962): 603-621.
- Starger, B.; Hill, C. y Matrone, G. «Importance of dietary copper in the formation of aortic elastin». *J. Nutrition* 43 (1975): 411-420.
- Suttle, N. «The role of organic sulphur in the copper-molybdenum-S interrelationship in ruminant nutrition». *Brit. J. Nutrition* 43 (1975): 411-420.