

# PHYSIOLOGICAL AND GENOTOXIC EFFECTS OF MOLYBDENUM-INDUCED COPPER DEFICIENCY IN CATTLE

## EFEECTO FISIOLÓGICO Y GENOTÓXICO DE LA DEFICIENCIA DE COBRE INDUCIDA POR MOLIBDENO EN BOVINOS

Sebastián Picco<sup>1,2,3</sup>, M. Virginia Ponzzinibio<sup>1,2</sup>, Guillermo Mattioli<sup>3</sup>, Diana Rosa<sup>3</sup>, Leonardo Minatel<sup>4</sup>, Luis Fazzio<sup>3</sup>, Analía Seoane<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria), UNLP-CONICET. Calle 60 y 118, B-1900-AVW, La Plata, Argentina. <sup>2</sup>CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Avenida Rivadavia 1917, C-1033-AAJ, Buenos Aires, Argentina. (aseoane@fcv.unlp.edu.ar). <sup>3</sup>Cátedra de Fisiología, Facultad Cs. Veterinarias, UNLP, Calle 60 y 118, B-1900-AVW, La Plata, Argentina. <sup>4</sup>Cátedra de Patología, Facultad Cs. Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Avenida Chorroarín 280, C-1427-CWO, Buenos Aires, Argentina

### ABSTRACT

Molybdenosis is a disease caused by the depressing effect of molybdenum (Mo) on the physiological availability of Copper (Cu). The present study was carried out in order to analyze the ability of Mo to cause damage on the DNA integrity and changes in membrane fatty acids by oxidative damage. Holstein male calves were fed a Mo-supplemented diet for 9 months. Variables evaluated were plasma Cu concentration, erythrocyte Cu content and SOD activity, comet assay and analysis of the fatty acid composition of erythrocyte membranes. The statistical design was a completely randomized with one single factor and two replications. Copper plasma concentration, erythrocyte copper concentration and Cu/Zn SOD activity were analyzed using the t test. Chi-square test was used to compare the number of cells with DNA damage, and one-way analysis of variance and Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) for fatty acid composition and lipid peroxidation. Results showed that Mo in the diet induced a depletion of hepatic Cu storage, a decrease of Cu plasma and erythrocyte levels, a fall in Cu/Zn-SOD activity, changes in membrane fatty acids composition and DNA damage. These results are in agreement with the three phases model of Cu deficiency and validate the occurrence of molybdenosis or secondary hypocuprosis. Further studies will be necessary to explore the mechanisms involved in the DNA damage and to distinguish primary molybdenum toxicosis from the molybdenum-induced copper deficiency.

**Key words:** molybdenum, copper deficiency, oxidative damage, DNA damage, *Bos taurus*, SOD activity.

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: april, 2011. Approved: january, 2012.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 46: 107-117. 2012.

### RESUMEN

La molibdenosis es una enfermedad causada por el efecto depresivo del molibdeno (Mo) en la disponibilidad fisiológica del cobre (Cu). El presente estudio se realizó para analizar la capacidad del Mo para causar daño en la integridad del ADN y cambios en los ácidos grasos de la membrana por el daño oxidativo. Becerros machos Holstein recibieron una dieta con un suplemento de Mo durante 9 meses. Las variables evaluadas fueron la concentración de Cu en el plasma, el contenido de Cu en eritrocitos y la actividad SOD, un ensayo cometa y el análisis de la composición de ácidos grasos de las membranas de eritrocitos. El diseño estadístico fue completamente al azar con un solo factor y dos réplicas. La concentración de cobre en el plasma, la concentración de cobre en eritrocitos y la actividad Cu/Zn-SOD se analizaron con la prueba de t. La prueba de Chi cuadrado se usó para comparar el número de células con daño del ADN, y el análisis de varianza en un sentido y la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para la composición de ácidos grasos y la peroxidación de lípidos. Los resultados mostraron que el Mo en la dieta indujo una reducción en el almacenaje hepático de Cu, una disminución de los niveles de Cu en el plasma y eritrocitos, una caída en la actividad Cu/Zn-SOD, cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana y daño del ADN. Estos resultados coinciden con el modelo de tres fases de deficiencia del Cu y validan la ocurrencia de molibdenosis o hipocuprosis secundaria. Se requieren más estudios para explorar los mecanismos involucrados en el daño del ADN y distinguir la toxicosis primaria por molibdeno de la deficiencia de cobre inducida por Mo.

**Palabras clave:** molibdeno, deficiencia de cobre, daño oxidativo, daño del ADN, *Bos taurus*, actividad SOD.

## INTRODUCTION

**M**olybdenum (Mo), an essential trace mineral in mammals (Turnlund *et al.*, 1995; NRC, 2005), is an integral component of several oxidase enzymes (e.g. xanthine oxidase, sulfite oxidase and aldehyde oxidase) which catalyze basic metabolic reactions in the carbon, sulfur and nitrogen cycles (Turnlund *et al.*, 1995; Thompson and Turnlund 1996; Barceloux, 1999). Molybdenum is slightly toxic to humans, whereas ruminant and non-ruminants animals are quite sensitive to ingesting of excessive amounts (Underwood and Suttle, 1999).

Molybdenum poisoning can be either natural, due to its accumulation in plants growing in areas of molybdeniferous rocks, or anthropogenic, as a result of industrial pollution when an excess of Mo containing fertilizer or lime or both are applied to the soil and appear to increase Mo uptake by plants (NRC, 2005; Raisbeck *et al.*, 2006; Kirchmann *et al.*, 2009). Herbage values of Mo can be greater than 230 mg kg<sup>-1</sup> of dry matter (DM) in areas with industrial contamination, while the normal values are less than 1 mg kg<sup>-1</sup> DM (NRC, 2005).

Molybdenosis (also called conditioned copper deficiency or secondary hypocuprosis) is a disease mostly characterized by the depressing effect of Mo on the physiological availability of copper (Cu), and it is similar to Cu deficiency in several respects (Erdman *et al.*, 1978). Most of the clinical signs are similar to those of hypocuprosis and include pale coat, anemia, spontaneous fractures, poor capillary integrity, myocardial degeneration, and spinal cord hypomyelination, impaired reproductive performance, lessening resistance to infectious disease, diarrhea and generalized ill health (Tessman *et al.*, 2001; Underwood and Suttle, 1999).

According to NRC (2001), the antagonistic action of Mo on Cu metabolism increases when sulfur levels are high; besides, in the rumen molybdate and sulfide interact to form thiomolybdates, whereas Cu would react with these compounds to produce insoluble complexes. Furthermore, the absorbed thiomolybdates affect the systemic metabolism of Cu resulting in Cu being tightly bound to plasma albumin rendering it unavailable for biochemical functions (Gooneratne *et al.*, 1989). Copper availability is required for structural and catalytic properties of many enzymes (e.g. Cu/Zn-SOD, ceruloplasmin)

## INTRODUCCIÓN

**E**l molibdeno (Mo), un mineral traza esencial en los mamíferos (Turnlund *et al.*, 1995; NRC, 2005), es un componente integral de varias enzimas oxidadas (por ejemplo, xantina-oxidasa, sulfito-oxidasa y aldehído-oxidasa), que catalizan reacciones metabólicas básicas en los ciclos de carbón, azufre y nitrógeno (Turnlund *et al.*, 1995; Thompson y Turnlund 1996; Barceloux, 1999). El Mo es ligeramente tóxico en humanos, mientras que los rumiantes y no rumiantes son bastante sensibles a la ingesta de cantidades excesivas (Underwood y Suttle, 1999).

La intoxicación por Mo puede ser natural, debido a su acumulación en plantas que crecen en zonas con rocas molibdeníferas, o antropogénica, debido a la contaminación industrial cuando se aplica al suelo un exceso de fertilizante o abono que contiene Mo y parece aumentar la absorción de Mo por las plantas (NRC, 2005; Raisbeck *et al.*, 2006; Kirchmann *et al.*, 2009). Los valores de Mo en herbaje pueden ser mayores de 230 mg kg<sup>-1</sup> de materia seca (MS) en zonas con contaminación industrial, mientras que los valores normales son menores a 1 mg kg<sup>-1</sup> MS (NRC, 2005).

La molibdenosis (también llamada deficiencia de cobre condicionada o hipocuprosis secundaria) es una enfermedad caracterizada principalmente por el efecto depresivo del Mo en la disponibilidad fisiológica del cobre (Cu), y es similar a la deficiencia de Cu en varios aspectos (Erdman *et al.*, 1978). La mayoría de los signos clínicos son similares a los de la hipocuprosis e incluyen pelaje pálido, anemia, fracturas espontáneas, integridad capilar pobre, degeneración del miocardio, e hipomielinización de la médula espinal, desempeño reproductivo deficiente, menor resistencia a las enfermedades infecciosas, diarrea y mala salud en general (Tessman *et al.*, 2001; Underwood y Suttle, 1999).

De acuerdo al NRC (2001), la acción antagonista del Mo en el metabolismo de Cu aumenta cuando los niveles de azufre son altos; además, en el rumen, el molibdato y el sulfuro interactúan para formar tiomolibdatos, mientras que el Cu podría reaccionar con estos compuestos para producir complejos insolubles. Además, los tiomolibdatos absorbidos afectan el metabolismo sistémico del Cu, y como resultado el Cu se une fuertemente a la albúmina del plasma,

linked to the antioxidant defense system (Uauy *et al.*, 1998; Gaetke and Chow, 2003; Lopez-Alonso *et al.*, 2005). Consequently, the association between copper deficiency and oxidative damage has been proposed (Webster *et al.*, 1996; Pan and Loo, 2000; Picco *et al.*, 2004). Therefore, the objective of this study was to analyze the ability of Mo to cause damage on the DNA integrity and changes in membrane fatty acids by way of oxidative damage.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental design

The experimental design was completely randomized and 20 Holstein male calves (n=20; 70-day-old; 68 kg mean body weight), placed in partially roofed 6 m<sup>2</sup> boxes (two calves per box) with a concrete floor, received during 9 months a diet with 60 % corn grain, 15 % commercial feed, 22 % wheat straw and 3 % mineral-vitamin mixture. Concentrations of Cu, Mo and S in the diet, verified by flame atomic absorption spectrophotometer, were as follows: Cu 3.8, Mo 0.4, S 1.8 g kg<sup>-1</sup> DM. After a three-week adaptation period, treatments were randomly assigned to calves as follows: control group (A; n=10) and Mo-supplemented group (B; n=10). The mineral-vitamin mixture (3 % of the total diet) increased Cu concentration to 10 mg kg<sup>-1</sup> DM in the 20 calves, whereas calves in group B also received 11 mg Mo kg<sup>-1</sup> DM and 3 g S kg<sup>-1</sup> DM.

### Blood samples and liver biopsies

Samples taken from the jugular vein were handled as follows: 1) 10 mL samples from each calf in a test tube containing EDTA (Gibco BRL, NY) were placed in an icebox, brought to the laboratory, centrifuged 10 min at 3000 rpm for separating the plasma and stored at 4 °C for further analysis. 2) Samples were placed in test tubes (Eurotubo®, Barcelona, Spain) containing lithium heparin as an anticoagulant, for determining fatty acid composition of erythrocytes. 3) Samples were collected in heparinized Vacutainer® tubes (Franklin Lakes, NJ, USA) for comet assay. Liver biopsies were obtained in four calves from each group following the protocol described by Swanson and coworkers (2000).

### Analysis of plasma copper concentration

Blood samples were centrifuged, the plasma fraction treated with 10 % trichloroacetic acid (w/v) to separate the supernatant and then plasma Cu concentration was determined by a flame atomic absorption spectrophotometer (double beam atomic

volviéndola no disponible para las funciones bioquímicas (Gooneratne *et al.*, 1989). La disponibilidad del Cu se requiere para las propiedades estructurales y catalíticas de muchas enzimas (por ejemplo, Cu/Zn-SOD, ceruloplasmina) relacionadas con el sistema de defensa antioxidante (Uauy *et al.*, 1998; Gaetke y Chow, 2003; Lopez-Alonso *et al.*, 2005). Por consiguiente, se ha propuesto la asociación entre la deficiencia de Cu y el daño oxidativo (Webster *et al.*, 1996; Pan and Loo, 2000; Picco *et al.*, 2004). Así, el objetivo de este estudio fue analizar la capacidad del Mo para causar daño en la integridad del ADN y cambios en los ácidos grasos de la membrana mediante el daño oxidativo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio, con 20 becerros machos Holstein (n=20; 70 d de edad; 68 kg peso corporal promedio), alojados en cajas parcialmente techadas de 6 m<sup>2</sup> (dos becerros por caja) con piso de concreto, que recibieron durante 9 meses una dieta de 60 % grano de maíz, 15 % alimento comercial, 22 % paja de trigo y 3 % mezcla de minerales y vitaminas. Las concentraciones de Cu, Mo y S en la dieta, verificadas por espectrofotómetro de absorción atómica con flama, fueron las siguientes: Cu 3.8, Mo 0.4, S 1.8 g kg<sup>-1</sup> MS. Después de un periodo de adaptación de tres semanas, se asignaron los tratamientos a los becerros al azar, de la siguiente manera: grupo testigo (A; n=10) y grupo con suplemento de Mo (B; n=10). La mezcla de minerales y vitaminas (3 % del total de la dieta) aumentó la concentración de Cu hasta 10 mg kg<sup>-1</sup> MS en los 20 becerros, mientras que los becerros en el grupo B recibieron además 11 mg Mo kg<sup>-1</sup> MS y 3 g S kg<sup>-1</sup> MS.

### Muestras de sangre y biopsias de hígado

Las muestras tomadas de la vena yugular se manejaron así: 1) las muestras de 10 mL de cada becerro en tubos de ensayo con EDTA (Gibco BRL, NY) se colocaron en un refrigerador, se llevaron al laboratorio, se centrifugaron 10 min a 3000 rpm para separar el plasma y se almacenaron a 4 °C para su análisis. 2) Las muestras se colocaron en tubos de ensayo (Eurotubo®, Barcelona, España) con heparina de litio como anticoagulante, para determinar la composición de ácidos grasos de los eritrocitos. 3) Las muestras se recolectaron en tubos Vacutainer® heparinizados (Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) para el ensayo cometa. Se obtuvieron biopsias de hígado en cuatro becerros de cada grupo, siguiendo el protocolo descrito por Swanson *et al.* (2000).

absorption spectrophotometer; GBC 902) using internal quality controls (Piper and Higgins, 1967).

#### **Erythrocyte copper content and superoxide dismutase activity**

The Cu content was determined in erythrocyte samples diluted in 1 mL of a solution of 4 mM manganese sulfate (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, USA) prepared in acetic acid (1 mM) and 1 mL of trichloroacetic acid 10 %. The samples were centrifuged 30 min at 3600 rpm and the supernatant was used for Cu determinations by atomic absorption spectrophotometry. In order to determine the erythrocyte Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) activity, the method described by Jones and Suttle (1981) was employed. This method evaluates the competitive inhibition of SOD in the reaction of the superoxide anion produced by the aerobic oxidation of xantine. The violet iodionitrotetrazolium changes its color when it is reduced by the superoxide anion (Beauchamp and Fridovich, 1971). The samples were analyzed with a spectrophotometer (Metrolab UV240) at 500 nm during 5 min (Xin *et al.*, 1991). The standard used for the assay was obtained from bovine red cells (Sigma, Saint-Louis, USA) and the results were expressed as IU mg<sup>-1</sup> hemoglobin. Hemoglobin in red cells and in whole blood samples was determined by the cianohemoglobin method using a commercial kit (Wiener Lab., Argentina) in a spectrophotometer (Metrolab UV240).

#### **Comet assay**

The method used for this assay was that described by Singh *et al.* (1988), with minor modifications. Samples were stored in the dark at 4 °C for up to 30 min and 15 µL aliquots of whole blood were mixed with 75 µL of 0.5 % low melting point agarose (Gibco BRL, NY), seeded on a slide coated with 0.5 % normal melting point agarose (Promega) and cooled until solidification. Two slides per calf were prepared and the cells lysed by incubation in a detergent solution [100 mM EDTA (Gibco BRL, NY), 2.5 M NaCl (Gibco BRL, NY), 10 mM Tris (USBiological, MA), 1 % Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO) and 10 % dimethyl sulfoxide] for at least 1 h and stored until electrophoresis. Before electrophoresis, the slides were equilibrated in alkaline electrophoresis solution [1 mM EDTA (Gibco BRL, NY), 300 mM NaOH (Carlo Erba, Milano, Italy), pH > 13] for 20 min. The electrophoresis was carried out for 30 min at 25 V and 300 mA (1.25 V/cm). Then, the slides were neutralized by washing them three times with Tris buffer (pH 7.5) for 5 min each time and once with distilled water. Slides were stained with 1/1000 SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, OR) solution (Ward and Marples 2000) and the analysis

#### **Análisis de la concentración de cobre en plasma**

Las muestras de sangre se centrifugaron, la fracción de plasma se trató con 10 % de ácido tricloroacético (w/v) para separar el sobrenadante y se determinó la concentración de Cu con un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (espectrofotómetro de absorción atómica de doble haz; GBC 902), usando controles de calidad internos (Piper y Higgins, 1967).

#### **Contenido de cobre en eritrocitos y actividad de superóxido dismutasa**

El contenido de Cu se determinó en muestras de eritrocitos diluidas en 1 mL de una solución de 4 mM sulfato de manganeso (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, EE.UU.) preparada en ácido acético (1 mM) y 1 mL de ácido tricloroacético al 10 %. Las muestras se centrifugaron 30 min a 3600 rpm y el sobrenadante se usó para determinar Cu por espectrofotometría atómica de absorción. Para determinar la actividad de Cu/Zn superóxido-dismutasa (SOD) se usó el método descrito por Jones y Suttle (1981). Este método evalúa la inhibición competitiva de SOD en la reacción del anión superóxido producido por la oxidación aeróbica de la xantina. El iodionitrotetrazolio violeta cambia su color cuando es reducido por el anión superóxido (Beauchamp y Fridovich, 1971). Las muestras se analizaron con un espectrofotómetro (Metrolab UV240) a 500 nm durante 5 min (Xin *et al.*, 1991). El estándar usado para el ensayo se obtuvo de células rojas de bovino (Sigma, Saint-Louis, EE.UU.) y los resultados se expresaron como UI mg<sup>-1</sup> hemoglobina. La hemoglobina en las células rojas y en las muestras de sangre entera se determinó con el método de cianohemoglobina usando un equipo comercial (Wiener Lab., Argentina) en un espectrofotómetro (Metrolab UV240).

#### **Ensayo cometa**

El método para este ensayo fue el descrito por Sing *et al.* (1988), con pequeñas modificaciones. Las muestras se almacenaron en oscuridad a 4 °C hasta 30 min y se mezclaron alícuotas de 15 µL de sangre entera con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 % (Gibco BRL, NY), se sembraron en un portaobjetos recubierto con agarosa de punto de fusión normal al 0.5 % (Promega) y se enfriaron hasta la solidificación. Se prepararon dos portaobjetos por becerro y las células sufrieron lisis al incubarlas en una solución de detergente [100 mM EDTA (Gibco BRL, NY), 2.5 M NaCl (Gibco BRL, NY), 10 mM Tris (US Biological, MA), 1 % Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO) y 10 % dimetilsulfóxido] por al menos 1 h y se almacenaron hasta la electroforesis. Antes de la electroforesis, los portaobjetos

was performed with an Olympus BX 40 microscope equipped with a 100 W high pressure mercury lamp (USHIO USH 102 D). Images were captured with a Sony CCD camera and saved using Image Pro Plus® software. The data for comet assay was recorded blind on coded slides. In total, 100 cells per calf were scored. DNA damage values were established according to Collins (2004).

#### **Analysis of the fatty acid composition of erythrocyte membranes**

The erythrocytes were isolated from the whole blood by centrifugation at 1000 g for 10 min at 4 °C. The buffy-coat and plasma were discarded, and the red cells washed three times in isotonic phosphate buffer (PBS 5 mM pH 7.4, 150 mM NaCl). The pellet was resuspended in isotonic phosphate buffer and the preparation of the erythrocyte membranes (ghosts) was carried out according to the method of Dodge *et al.* (1963) with minor modifications. Briefly, packed washed erythrocytes were lysed by mixing 10 vol of 5 mM phosphate buffer pH 7.4 at 4 °C. After incubation on ice for 30 min, the erythrocyte membranes were centrifuged and the supernatant containing hemoglobin was removed. The membranes were washed three times in fresh buffer (10 vol) followed by centrifugation at 20 000 g and 4 °C for 10 min. Finally, the membranes were resuspended in isotonic 5 mM buffer (same volume used for lyses) after which they were centrifuged under the same conditions and resuspended in isotonic 5 mM phosphate buffer pH 7.4. Erythrocyte membranes were quantified taken into account the protein concentration determined by Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951). Lipids from erythrocyte membrane samples were extracted with chloroform/methanol (2:1, v/v) (Folch *et al.*, 1957). Fatty acids were transmethylated with 20 % F3B in methanol at 65 °C for 3 h. Fatty acid methyl esters were analyzed with GC-14A gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a packed column (1.8m × 4mm i.d.; J and V Scientific, Folsom, CA, USA) GP 10% DEGSPS on 80/100 Supelcoport, using nitrogen as carrier gas. The injector and detector temperatures were kept at 250 °C, and the column temperature was held 60 min at 200 °C. Fatty acid methyl esters peaks were identified by comparison of their retention times with the ones of standard compounds and the composition expressed as percentage by area of total fatty acid.

#### **Statistical analysis**

The experimental design was completely randomized with one single factor and two replications. Means of copper plasma and erythrocyte copper concentration, fatty acid composition,

se equilibraron en solución alcalina para electroforesis [1 mM EDTA (Gibco BRL, NY), 300 mMNaOH (Carlo Erba, Milán, Italia), pH > 13] por 20 min. La electroforesis se realizó por 30 min a 25 V y 300 mA (1.25 V/cm). Después, los portaobjetos se neutralizaron al lavarlos tres veces con amortiguador Tris (pH 7.5) por 5 min en cada ocasión y una vez con agua destilada. Los portaobjetos se tiñeron con solución 1/1000 SYBR Verde I (Molecular Probes, Eugene, OR) (Ward y Marples, 2000) y el análisis se realizó con un microscopio Olympus BX 40 equipado con una lámpara de mercurio de alta presión de 100 W (USHIO USH 102 D). Las imágenes se capturaron con una cámara Sony CCD y se guardaron usando software Image Pro Plus®. Los datos para el ensayo cometa se registraron a ciegas en portaobjetos codificados. En total, se analizaron 100 células por becerro. Los valores de daño del ADN se establecieron con base en Collins (2004).

#### **Análisis de la composición de ácidos grasos de las membranas de eritrocitos**

Los eritrocitos se aislaron de la sangre entera por centrifugación a 1000 g por 10 min a 4 °C. La capa leucocitaria y el plasma se desecharon, y las células rojas se lavaron tres veces en amortiguador isotónico de fosfato (PBS 5 mM pH 7.4, 150 mM NaCl). El pellet se resuspendió con amortiguador isotónico de fosfato y la preparación de las membranas de eritrocitos (fantasmas) se realizó según el método de Dodge *et al.* (1963), con pequeñas modificaciones. Brevemente, los eritrocitos sellados lavados sufrieron lisis al mezclar 10 vol de 5 mM amortiguador de fosfato pH a 4 °C. Después de incubarlas en hielo por 30 min, las membranas de eritrocitos se centrifugaron y el sobrenadante que contenía hemoglobina se removió. Las membranas se lavaron tres veces en amortiguador fresco (10 vol) y se centrifugaron a 20 000 g y 4 °C por 10 min. Finalmente, las membranas se resuspendieron en 5 mM amortiguador isotónico (el mismo volumen usado para la lisis): después se centrifugaron bajo las mismas condiciones y se resuspendieron en 5 mM amortiguador de fosfato pH 7.4. Las membranas de eritrocitos se cuantificaron tomando en cuenta la concentración de proteína determinada por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Los lípidos de las muestras de membranas de eritrocitos se extrajeron con cloroformo/metanol (2:1, v/v) (Folchet *et al.*, 1957). Los ácidos grasos se transmetilaron con 20 % F3B en metanol a 65 °C por 3 h. Los ésteres metilo de ácidos grasos se analizaron con un cromatógrafo de gas GC-14A (Shimadzu, Kioto, Japón) equipado con una columna sellada (1.8 m × 4 mm i.d.; J and V Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) GP 10 % DEGSPS en 80/100 Supelcoport, usando nitrógeno como gas acarreador. Las temperaturas del inyector y detector se mantuvieron a 250 °C, y la temperatura de la columna 60 min a 200 °C. Los picos de ésteres metilo de ácidos grasos se identificaron



lipid peroxidation and Cu/Zn SOD activity were analyzed using the t test (SSPS®). For this analysis, treatment was considered as a fixed variable and each calf as the random variable. Chi-square test was used to compare the number of cells with DNA damage from groups.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Analysis of plasma copper concentration

Calves were classified as normocupremic: 60-120 mg dL<sup>-1</sup>; moderate hypocupremic: 30-59 mg dL<sup>-1</sup>; severe hypocupremic: <30 mg dL<sup>-1</sup>, following the Suttle's classification (Suttle, 1983). Data are shown in Table 1.

After three months, control calves (Group A) presented a Cu plasma level  $\geq 60 \mu\text{g dL}^{-1}$  (normocupremic) while those fed Mo supplement (Group B) were hypocupremic ( $p \leq 0.01$ ). In addition, results from four calves per group showed a marked decrease in hepatic Cu concentrations in Group B ( $10.91 \pm 2.43$  ppm) compared to Group A ( $153.5 \pm 61.42$  ppm).

### Erythrocyte Cu content and Cu/Zn-SOD activity

Copper content and Cu/Zn-SOD activity were higher ( $p=0.047$  and  $p \leq 0.01$ ) in erythrocytes obtained from control calves (Group A) than in

por comparación de sus tiempos de retención con los de compuestos estándar y la composición se expresó como porcentaje por área del ácido graso total.

### Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio con un solo factor y dos réplicas. Los promedios de cobre en el plasma y concentración de cobre en eritrocitos, la composición de ácidos grasos, la peroxidación de lípidos y la actividad Cu/Zn-SOD se analizaron usando la prueba de t (SSPS®). Para este análisis, el tratamiento se consideró como una variable fija y cada becerro como una variable aleatoria. La prueba de Chi se usó para comparar el número de células con daño del ADN en los grupos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de concentración de cobre en el plasma

Los becerros se clasificaron como normocuprémicos: 60-120 mg dL<sup>-1</sup>; hipocuprémicos moderados: 30-59 mg dL<sup>-1</sup>; hipocuprémicos severos: <30 mg dL<sup>-1</sup>, siguiendo la clasificación de Suttle (Suttle, 1983). Los datos se muestran en el Cuadro 1.

Después de tres meses, los becerros testigo (Grupo A) presentaron un nivel de Cu en el plasma  $\geq 60 \mu\text{g dL}^{-1}$  (normocuprémicos), mientras que los alimentados con suplemento de Mo (Grupo B) fueron hipocuprémicos ( $p \leq 0.01$ ). Además, los resultados de cuatro becerros por grupo mostraron una disminución marcada de concentraciones de Cu hepático en el Grupo B ( $10.91 \pm 2.43$  ppm), comparado con el Grupo A ( $153.5 \pm 61.42$  ppm).

### Contenido de Cu y actividad Cu/Zn-SOD en eritrocitos

El contenido de cobre y la actividad Cu/Zn-SOD fueron mayores ( $p=0.047$  y  $p \leq 0.01$ ) en los eritrocitos obtenidos de becerros testigo (Grupo A) que en eritrocitos de aquellos alimentados con suplemento de Mo (Grupo B).

### Composición de ácidos grasos de membranas de eritrocitos

La concentración de ácidos grasos monoinsaturados C18 disminuyó mientras que la de ácidos grasos saturados C18 aumentó. Además, el nivel de ácidos

**Table 1. Copper plasma levels, erythrocyte copper levels and Cu/Zn-SOD activity ( $\pm$  standard deviation) in control (Group A) and Mo-supplemented calves (Group B).**

**Cuadro 1. Niveles de cobre en el plasma, niveles de cobre en eritrocitos y actividad Cu/Zn-SOD ( $\pm$ desviación estándar) en becerros control (Grupo A) y complementados con Mo (Grupo B).**

	Group	Mean $\pm$ standard deviation
Cu plasma concentration ( $\mu\text{g dL}^{-1}$ )	A	74.41 ( $\pm 4.53$ )
	B	31.17 ( $\pm 1.71$ )
Erythrocyte Cu content ( $\mu\text{g g}^{-1}$ Hg)	A	3.83 ( $\pm 0.28$ )
	B	2.89 ( $\pm 0.69$ )
Erythrocyte Cu/Zn-SOD activity (IU $\text{mg}^{-1}$ Hg)	A	0.549 ( $\pm 0.08$ )
	B	0.346 ( $\pm 0.06$ )

erythrocytes from those fed Mo supplement (Group B).

**Fatty acid composition of erythrocyte membranes**

The concentration of monounsaturated C18 fatty acids decreased while that of C18 saturated fatty acids was increased. Besides, the rate of saturated fatty acids was higher in Group B calves than in those from Group A which showed a lower total unsaturated fatty acid incidence (Table 2).

**DNA damage**

Results from the comet assay (Table 3) show that the number of cells with DNA damage was higher in Group B calves than in Group A (196 vs. 144; X<sup>2</sup>=5.13; p=0.023), whereas the index damage was 91.6 in Group B and 72.4 in Group A (p≤0.05).

Results presented here are in agreement with the three phases model of copper deficiency (depletion, deficiency and dysfunction) described by Underwood and Suttle (1999); and confirm the occurrence of molybdenosis or secondary hypocuprosis in the calves. Hepatic copper storage was fourteen fold lower in Mo-supplemented than in the control calves. Hepatic copper is used in the synthesis of ceruloplasmin (Cp), which is the main form of Cu storage in plasma (it contains about 95 % of plasmatic Cu). Thus, during extended periods of copper depletion, low Cu plasma levels generate a fall in tissue Cu content and erythrocyte Cu concentration.

grasos saturados fue mayor en los becerros del Grupo B que en los del Grupo A, que mostró un total de incidencia menor de ácidos grasos insaturados (Cuadro 2).

**Daño del ADN**

Los resultados del ensayo cometa (Cuadro 3) muestran que el número de células con daño del ADN fue mayor en los becerros del Grupo B que en los del Grupo A (196 vs. 144; X<sup>2</sup>=5.13; p=0.023), mientras que el índice de daño fue 91.6 en el Grupo B y 72.4 en el Grupo A (p≤0.05).

Los resultados presentados aquí coinciden con el modelo de tres fases de deficiencia de cobre (reducción, deficiencia y disfunción) descritos por Underwood y Suttle (1999); y confirman la presencia de molibdenosis o hipocuprosis secundaria en los becerros. El almacenaje de Cu hepático se redujo 14 veces más en los que recibieron Mo suplementario que en los becerros testigo. El cobre hepático se usa en la síntesis de ceruloplasmina (Cp), que es la forma principal de almacenaje de Cu en el plasma (contiene alrededor de 95 % de Cu plasmático). Así, en periodos extensos de reducción de cobre, los niveles bajos de Cu en plasma reducen el contenido de Cu en los tejidos y su concentración en los eritrocitos.

Además de un contenido bajo de Cu en eritrocitos, se redujo la actividad Cu/Zn-SOD que cataliza la destrucción de los radicales libres de O<sub>2</sub> y protege a las células contra los efectos dañinos de los radicales

**Table 2. Fatty acids composition (% ± standard deviation) from membrane erythrocytes of control (Group A) and Mo-supplemented calves (Group B).**

**Cuadro 2. Composición de ácidos grasos (% ± desviación estándar) de membranas de eritrocitos de becerros testigo (Grupo A) y con suplemento de Mo (Grupo B).**

Fatty acid	Group A (normocupremics)	Group B (hypocupremics)	Significance level p≤
16:0	17.03 (±0.4)	18.43 (±0.7)	0.13
C16:1	1.59 (±0.48)	1.75 (±0.14)	0.76
C18:0	17.7 (±0.69)	22.48 (±1.24)	0.015*
C18:1	36.2 (±0.89)	32.51 (±0.99)	0.033*
C18:2	17.92 (±1.02)	15.95 (±0.74)	0.17
C20:4	8.56 (±0.51)	8.81 (±0.38)	0.12
Saturated	34.73 (±0.74)	40.91 (±1.93)	0.024*
Mono unsaturated	37.79 (±1.31)	34.26 (±1.01)	0.077
Poli unsaturated	26.49 (±0.76)	24.82 (±0.92)	0.21
Total unsaturated	64.27 (±1.25)	59.08 (±1.93)	0.065
Saturated/unsaturated	0.54 (±0.02)	0.7 (±0.06)	0.038*

\* Significant differences (p≤0.05)between Group A and B ♦ Diferencias significativas (p≤0.05) entre Grupo A y B.

**Table 3. Frequency of damaged cells and DNA index damage (mean  $\pm$  standard deviation) measured by the comet assay in calves (Group A and B).**

**Cuadro 3. Frecuencia de células dañadas e índice de daño del ADN (promedio  $\pm$  desviación estándar) medida por el ensayo cometa en becerros (Grupo A y B).**

	Damaged cells	Index damage
Group A	0.144	72.4 ( $\pm$ 22.2)
Group B	0.196	91.6 ( $\pm$ 28.8)

Along with low erythrocyte Cu content, there was a decrease in the Cu/Zn-SOD activity which catalyzes the destruction of the  $O_2^-$  free radical and protects cells against the harmful effects of superoxide free radicals (Fridovich, 1972; Paschen and Weser, 1973; Petkau *et al.*, 1975). This finding, coupled with the increase of C18:0 and total saturated fatty acids concentration, could indicate an oxidative effect of Mo-induced Cu deficiency. There is no evidence that molybdenosis *per se* nor Cu deficiency are capable of inducing changes in membrane fatty acids composition in cattle. However, there is a similar pattern of C18:0 and C18:1 in thymic lymphocyte membranes of Cu-deficient mice (Korte and Prohaska, 1987) and adipose tissue of pigs (Ovecka *et al.*, 1988). Some findings in rats allowed to associate changes in membrane fatty acids composition with altered  $\Delta 9$ -desaturase activities (Whale and Davies, 1975); however, further studies did not confirm this result (Ovecka *et al.*, 1988; Korte and Prohaska, 1987). Besides, hypocuprosis is associated with an increase in lipid peroxidation and oxidative damage in cattle and rats (Jain and Williams, 1988; Picco *et al.*, 2004).

There is no evidence about Mo genotoxicity in mammalian cells. Only some molybdenum salts would induce genotoxicity at relatively high doses both *in vitro* in human cells and *in vivo* in mice (Titenko-Holland *et al.*, 1998). It is therefore reasonable to assume that Mo-induced copper deficiency would explain the increase of DNA damage found in Mo-supplemented calves.

Oxidative stress might explain the increase in DNA damage considering two lines of evidence that suggest extracellular and intracellular pathways leading to genotoxic effect. First, Cp is the main cupremic determinant and appears to be one of the most sensitive enzymes to copper deficiency (Bingley

libres superóxidos (Fridovich, 1972; Paschen y Weser, 1973; Petkau *et al.*, 1975). Este hallazgo, junto con el aumento de C18:0 y la concentración total de ácidos grasos saturados, podría indicar un efecto oxidativo de la deficiencia de Cu inducida por Mo. No hay evidencia de que la molibdenosis *per se* o la deficiencia de Cu puedan inducir cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana en bovinos. Sin embargo, hay un patrón similar de C18:0 y C18:1 en membranas de linfocitos del timo de ratones deficientes en Cu (Korte y Prohaska, 1987) y de tejido adiposo de cerdos (Ovecka *et al.*, 1988). Algunos hallazgos en ratas permitieron asociar los cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana con actividades alteradas de  $\Delta 9$ -desaturasa (Whale y Davies, 1975); no obstante, otros estudios no confirmaron esos resultados (Ovecka *et al.*, 1988; Korte y Prohaska, 1987). Además, la hipocuprosis se asocia con un aumento en la peroxidación de lípidos y el daño oxidativo en bovinos y ratas (Jainy Williams, 1988; Picco *et al.*, 2004).

No existe evidencia sobre la genotoxicidad de Mo en células de mamíferos. Sólo algunas sales de molibdeno podrían inducir genotoxicidad a dosis relativamente altas tanto *in vitro* en células humanas como *in vivo* en ratones (Titenko-Holland *et al.*, 1998). Por tanto, es razonable suponer que la deficiencia de cobre inducida por Mo podría explicar el aumento en daño del ADN encontrado en becerros que reciben Mo suplementario.

El estrés oxidativo podría explicar el aumento en daño del ADN considerando dos líneas de evidencia que sugieren vías extracelulares e intracelulares que producen un efecto genotóxico. Primero, Cp es el principal determinante cuprémico y parece ser una de las enzimas más sensibles a la deficiencia de cobre (Bingley y Anderson, 1972; Blakley y Hamilton, 1985). Según Blakley y Hamilton (1985), Weiss (1989) y Saenko *et al.* (1994), Cp actúa como un buscador extracelular de radicales libres en el plasma, protegiendo así a las células contra especies de oxígeno reactivas que se liberan de neutrófilos y macrófagos. Además, la actividad ferroxidasa de Cp es mediadora de la oxidación de iones ferrosos al estado férrico, evitando la formación dependiente de iones férricos de radicales hidroxil vía la reacción Fenton. Se puede esperar una reducción de hasta un tercio en la actividad de CP durante la molibdenosis (NRC, 2005).



and Anderson, 1972; Blakley and Hamilton, 1985). According to Blakley and Hamilton (1985), Weiss (1989) and Saenko *et al.* (1994), Cp acts as an extracellular scavenger of free radicals in plasma, thus protecting the cells against reactive oxygen species released from neutrophils and macrophages. In addition, the ferroxidase activity of Cp mediates oxidation of ferrous ions to the ferric state, preventing ferrous ion-dependent formation of hydroxyl radicals via the Fenton reaction. And a reduction of up to third in Cp activity can be expected during molybdenosis (NRC, 2005).

In addition, we found a significant decrease in one of the main antioxidant enzymes, Cu/Zn-SOD. These findings agree with the increase in the activity of the xantine oxidase (XO) enzyme and the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during molybdenosis (NRC, 2005); and with the fact that enzymes with antioxidant activity not requiring Cu as a cofactor (such as catalase and glutathione peroxidase) are negatively influenced by Cu unavailability, increasing free radicals in the cells (Strain, 1994).

Changes of membrane fatty acid composition, low Cu/Zn-SOD activity and DNA damage were due to the presence of Mo in the diet that may cause a reduction of the Cu availability at the cellular level in the calves. Therefore, an increase in the Mo-induced oxidative stress might explain genotoxic effect and fatty acid modifications by taking into account the relation between Mo-induced Cu deficiency and impairment of the antioxidant system. Models similar to that reported here, successfully explained the progress of copper deficiency and its consequences although they did not consider molybdenosis *per se* as an important factor (Arthington *et al.*, 1996; Gengelbach and Spears, 1998).

## CONCLUSIONS

Molybdenum could induce DNA damage through copper deficiency, being this condition caused by oxidative mechanisms. Changes of membrane fatty acid composition and decrease in Cu/Zn-SOD activity support this point. Further studies will be necessary to explore the mechanisms involved in the oxidative damage generation when the amount of dietary Mo is higher than the normal expected value; and to distinguish primary molybdenum toxicosis from the molybdenum-induced copper deficiency.

Además, se encontró una disminución significativa en una de las enzimas antioxidantes principales, Cu/Zn-SOD. Estos resultados coinciden con el aumento en la actividad de la enzima xantina-oxidasa (XO) y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la molibdenosis (NRC, 2005); y con el hecho de que las enzimas con actividad antioxidante que no requieren Cu como cofactor (como catalasa y glutatión peroxidasa) están influidas negativamente por la no disponibilidad de Cu, aumentando los radicales libres en las células (Strain, 1994).

Los cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana, la baja actividad de Cu/Zn-SOD y el daño del ADN se debieron a la presencia de Mo en la dieta que puede causar una reducción de la disponibilidad de Cu a nivel celular en los becerros. Por tanto, un aumento en el estrés oxidativo inducido por Mo podría explicar el efecto genotóxico y las modificaciones en ácidos grasos, tomando en cuenta la relación entre la deficiencia de Cu inducida por Mo y el impedimento en el sistema antioxidante. Modelos similares a los reportados aquí han explicado con éxito el progreso de la deficiencia de cobre y sus consecuencias, aunque no consideran molibdenosis *per se* como un factor importante (Arthington *et al.*, 1996; Gengelbach y Spears, 1998).

## CONCLUSIONES

El molibdeno podría inducir daño del ADN a través de la deficiencia de cobre, siendo esta condición causada por mecanismos oxidativos. Los cambios en la composición de ácidos grasos de membranas y la disminución en actividad Cu/Zn-SOD apoyan esta propuesta. Serán necesarios más estudios para explorar los mecanismos involucrados en la generación de daño oxidativo cuando la cantidad de Mo en la dieta es mayor que el valor normal esperado; y para distinguir la toxicosis primaria por molibdeno de la deficiencia de cobre inducida por molibdeno.

—Fin de la versión en Español—

-----\*

## ACKNOWLEDGMENTS

This study received support through grants from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República

Argentina (PICT 1841-2006), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación Argentina. Authors are grateful to Prof. Ana Insausti for the correction of the manuscript.

## LITERATURE CITED

- Arthington, J. D., L. Corachet, and F. Blecha. 1996. The effect of molybdenum-induced copper deficiency on acute-phase protein concentrations, superoxide dismutase activity, leukocyte numbers and lymphocyte proliferation in beef heifers inoculated with bovine herpesvirus-1. *J. Anim. Sci.* 74: 211-217.
- Barceloux, D. G. 1999. Molybdenum. *J. Toxicol. Clinical Toxicol.* 37: 231-237.
- Beauchamp, C., and E. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays an assay applicable to acrylamide gels. *Ann. Biochem.* 44: 276-287.
- Bingley, L., and M. Anderson. 1972. Clinically silent hipocuprosis and the effect of molybdenum loading on beef calves in Gippsland, Victoria. *Austr. J. Agric. Res.* 23: 885-904.
- Blakley, B., and D. Hamilton. 1985. Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep. *Can. J. Comparative Medicine* 49: 405-408.
- Collins, A. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnol.* 26: 249-261.
- Dodge, T., D. Mitchell, and D. Hanahan. 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophysics* 100: 119-30.
- Erdman, J., R. Ebens, A. Arthur and A. Case. 1978. Molybdenosis: A potential problem in ruminants grazing on coal mine spoils. *J. Range Manage.* 31: 34-36.
- Folch, J, N. Lees, and G. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Fridovich, I. 1972. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Accounts Chem. Res.* 5: 321.
- Gaetke, L., and C. Chow. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189: 147-163.
- Gengelbach, G., and J. Spears. 1998. Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production and humoral immune response of calves. *J. Dairy Sci.* 81: 3286-3292.
- Gooneratne, R, W. Buckley, and D. Christensen. 1989. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 69: 819-845.
- Jain, S. K., and D. M. Williams. 1988. Copper deficiency anemia: altered red blood cell lipid and viscosity in rats. *Am. J. Clinical Nutr.* 48: 637-640.
- Jones, D., and N. Suttle. 1981. Some effects of copper deficiency on leucocyte function in sheep and cattle. *Res. Vet. Sci.* 31: 151-156.
- Korte, J., and J. Prohaska. 1987. Dietary copper deficiency alters protein and lipid composition of murine lymphocyte plasma membranes. *J. Nutr.* 117: 1076-1084.
- Lopez Alonso, M., F. Prieto, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernandez, and J. Bedito. 2005. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. *Vet. J.* 169: 262-269.
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- NRC. 2001. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, National Research Council: Washington DC. National Academic Press (eds). Chapter 6, Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition. pp: 140-141.
- NRC. 2005. Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals, National Research Council: Washington DC. National Academic Press (eds). Chapter 21, Mineral Tolerance of Animals: Second Revised Edition. pp: 262-275.
- Ovecka, G., G. Miller, and D. Medeiros. 1988. Fatty acids of liver, cardiac and adipose tissues from copper-deficient rats. *J. Nutr.* 118: 480-486.
- Pan, Y., and G. Loo. 2000. Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Radical Biol. Med.* 28: 824-830.
- Paschen, W., and U. Weser. 1973. Singlet oxygen decontaminating activity of erythrocyte (superoxide dismutase). *Biochem. et Bioph. Acta* 327: 217.
- Petkau, A., W. Chelack, S. Pleskach, B. Meeker, and C. Brady. 1975. Radioprotection of mice by superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 886.
- Picco, S. J., G. Mattioli, L. Fazio, D. Rosa, J. De Luca, and F. Dulout. 2004. Association between copper plasma level and DNA damage in cattle. *Mutagenesis* 19: 453-456.
- Piper, H., and G. Higgins. 1967. Estimation of trace metals in biological material by atomic absorption spectrophotometry. *Proc. Assoc. Clin. Biochem.* 7: 190-195.
- Saenko, E., A. Yaropolov, and E. Harris. 1994. Biological functions of caeruloplasmin expressed through copper-binding site and cellular receptor. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 7: 69-88.
- Singh, N. P., M. McCoy, R. Tice, and E. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Strain, J. 1994. Newer aspects of micronutrients in chronic disease: copper. *Proc. Nutr. Soc.* 53: 583-598.
- Swanson, K. S., N. Merchen, J. Erdman, J. Drackley, F. Orias, G Douglas, and J. Huhn. 2000. Technical note: a technique for multiple liver biopsies in neonatal calves. *J. Anim. Sci.* 78: 2459-2463.
- Tessman, R. K., J. Lakritz, J. Tyler, S. Casteel, J. Williams, and R. Dew. 2001. Sensitivity and specificity of serum copper determination for detection of copper deficiency in feeder calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218: 756-760.
- Thompson, K., and J. Turnlund. 1996. Kinetic model of molybdenum metabolism developed from dual stable isotope excretion in men consuming a low molybdenum diet. *J. Nutr.* 126: 963-972.
- Titenko-Holland, N., J. Shao, L. Zhang, L. Xi, H. Ngo, N. Shang, and M. T. Smith, 1998. Studies on the genotoxicity of molybdenum salts in human cells in vitro and in mice in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 32: 251-259.
- Turnlund, J., W. Keyes, G. Peiffer, and G. Chiang. 1995. Molybdenum absorption, excretion, and retention studied

- with stable isotopes in young men during depletion and repletion. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 1102-1109.
- Uauy, R., M. Olivares, and M. Gonzalez. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clinical Nutr.* 67: 952S-959S.
- Underwood, E., and N. Suttle. 1999. *The Mineral Nutrition of Livestock*. Third ed. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp: 214-235.
- Webster, R., M. Gawde, and R. Bhayfacharya. 1996. Modulation by dietary copper of aflatoxin B1 activity of DNA repair enzymes poli(ADPribose) polymerase, DNA polymerase B and DNA ligase. *In Vivo* 10: 533-536.
- Weiss, S. L. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-376.
- Whale, K., and N. Davies. 1975. Effect of dietary copper deficiency in the rat on fatty acid composition of adipose tissue and desaturase activity of liver microsomes. *Br. J. Nutr.* 34: 105-112.
- Xin, Z., D. Waterman, R. Hemken, and R. Harmon. 1991. Effects of copper status on neutrophils function, superoxide dismutase and copper distribution in steers. *J. Dairy Sci.* 74: 3078-3085.