

Influencia del estatus de cobre sobre la acumulación de metales tóxicos y esenciales en ganado vacuno

Blanco Penedo I*, Cruz JM, López-Alonso M, Miranda M¹, Castillo C, Hernández J y Benedito JL

Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela. 27002 Lugo, España

¹Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela. 27002 Lugo, España

Recibido 21 de Enero de 2005 / Aceptado 27 de Abril de 2005

Resumen: La interacción entre elementos tóxicos y esenciales, así como de elementos esenciales entre sí, condiciona tanto la acumulación de estos elementos en el organismo como sus efectos nocivos. En este estudio se evaluaron las correlaciones entre los niveles de cobre y los elementos tóxicos (cadmio, plomo) y esenciales (molibdeno, hierro, selenio, zinc, manganeso y cobalto) en dos tejidos (hígado y riñón) de 195 terneros procedentes de la comarca del Deza (NO de España), una zona donde hay una intensa ganadería de porcino en intensivo y los animales presentan con frecuencia niveles muy elevados de cobre en hígado. Los niveles de metales se determinaron por ICP-OES y las correlaciones entre elementos se calcularon empleando el coeficiente de correlación de Spearman. Los resultados de nuestro estudio indican que la exposición a niveles elevados de cobre en terneros en la comarca del Deza da lugar a una mayor deposición de plomo a nivel hepático, una menor acumulación de cadmio en hígado y a nivel renal a una tendencia en el mismo sentido. En cuanto a los elementos esenciales, el carácter positivo de las correlaciones encontradas entre cobre, molibdeno, zinc e hierro indica que la exposición a niveles altos de cobre en nuestros animales no parece tener un efecto antagónico sobre dichos elementos directamente relacionados con el estatus y necesidades fisiológicas de cobre. Por el contrario, la asociación entre los niveles de cobre y selenio a nivel orgánico podría indicar un daño oxidativo en los animales expuestos a niveles altos de cobre, o de forma alternativa, un papel potenciador del selenio en la acumulación de cobre a nivel hepático

Palabras clave: acumulación de cobre, ganado vacuno, interacción entre metales, metales tóxicos y esenciales.

Abstract: Influence of copper status on the accumulation of toxic and essential metals in cattle. Interactions between toxic and essential metals, as well as among essential metals themselves, can modulate their accumulation and toxicity. In this study, correlations between copper and toxic (cadmium, lead) and essential elements (molybdenum, iron, selenium, zinc, manganese and cobalt) were evaluated in tissues (liver, kidney) of 195 calves from the region of Deza (NW of Spain), where there is intensive pig farming and the animals usually have high hepatic copper concentrations. Metal concentrations were determined

by ICP-OES, and correlations between pairs of elements were determined from Spearman rank correlations. Our results indicated that the high copper exposure in calves in the region of Deza lead to a higher hepatic lead deposition, a lower cadmium accumulation in liver, and a lower cadmium accumulation in the kidney. In relation to the essential elements, the positive association among copper, molybdenum, iron and zinc indicate that the high copper exposure in our animals does not have an antagonistic effect on these essential elements that is directly related to copper status. On the contrary, the association between copper and selenium could indicate that animals exposed to high copper levels are suffering oxidative damage, or alternatively, the potential role of selenium on copper accumulation in the liver.

Key words: accumulation of copper, cattle, metal interactions, toxic and essential elements.

Introducción

Las principales emisiones de elementos contaminantes al medio ambiente son producidas por la actividad humana; de hecho, el desarrollo industrial, agrícola y zootécnico ha sido responsable de la difusión de numerosos contaminantes en el medio ambiente [1]. En lo que se refiere al cobre, esta contaminación se debe fundamentalmente al uso de purines de cerdo y gallinaza como fertilizantes, puesto que en las dietas de especies domésticas se añaden altas concentraciones de cobre y zinc como promotores de crecimiento [2].

La exposición a elementos tóxicos en dosis elevadas provoca efectos letales, mientras que a dosis bajas conduce a efectos crónicos [3]. Por otro lado, la exposición a niveles anormales de elementos esenciales (entre los que se incluye el cobre) también puede ocasionar problemas de salud así como una merma de las producciones [4]. Además, la susceptibilidad de los animales a la acumulación de metales y a sus efectos nocivos en el organismo está condicionada por un número de factores, entre ellos, uno de los más importantes es la interacción entre elementos tóxicos y esenciales. Con su estudio, se permite conocer los mecanismos homeostáticos encargados de regular el equilibrio mineral, muchos de ellos basados en competiciones entre elementos tóxicos y esenciales [5].

Existen numerosos ejemplos en la literatura científica de interacciones del cobre con otros elementos. La primera en registrarse fue la interacción entre el cobre y el hierro y está asocia-

Correspondencia: Isabel Blanco Penedo. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. 27002 Lugo. Tel:+34 982 25 23 03; fax: +34 984 28 59 40, e-mail: ibpenedo@lugo.usc.es.

da a la síntesis de hemoglobina [6]. Desde entonces, se han descrito numerosas interacciones como la que ocurre entre el cadmio, cobre y zinc, [7, 8] y cuya principal consecuencia es una deficiencia secundaria de cobre cuando los niveles de exposición a cadmio son altos. La interacción triple entre cobre-molibdeno y azufre también está perfectamente registrada [9]; así, los requerimientos diarios de cobre vienen determinados en gran medida por los niveles de molibdeno y azufre en la dieta.

En Galicia, en un estudio previo en el que se determinaron los niveles de elementos tóxicos y esenciales en ganado vacuno procedente de toda la comunidad [10] se observó como en la comarca del Deza, que cuenta con una importante producción de porcino en intensivo y donde se emplean con frecuencia purines de cerdo con niveles elevados de este elemento como fertilizantes en los pastos destinados al ganado vacuno, los niveles de cobre en terneros pasteros son muy elevados en comparación a otras zonas agrícolas. Se observó además una gran variabilidad en los niveles de cobre en terneros procedentes de explotaciones donde los animales se alimentan con productos locales y donde aproximadamente un 20% de los terneros muestreados presentan niveles de cobre en hígado asociados a toxicidad (>150 mg/kg peso fresco).

En este estudio se pretende valorar si la acumulación de cobre en terneros en la comarca del Deza por encima de los niveles de normalidad ejerce una influencia significativa sobre los niveles de otros elementos tóxicos y esenciales, por otro lado, comprobar si la acumulación de cobre puede verse influenciada por los niveles de otros elementos.

Material y métodos

Se recogieron muestras de hígado y riñón de 195 animales procedentes de la comarca del Deza (NE de la provincia de Pontevedra) durante el verano de 2001. Todos los animales muestreados eran de similares características, con una edad comprendida entre los 6 y 12 meses, que se mantuvieron durante todo su ciclo productivo en la misma explotación, recibiendo una alimentación basada fundamentalmente en productos locales.

Las muestras se recogieron en el momento de sacrificio de los animales. La muestra de hígado se tomó del *lobus caudatus* y la del riñón de la mitad anterior del derecho. Las muestras se recogieron en bolsas de polipropileno y se transportaron al laboratorio donde se congelaron a -18°C hasta su posterior análisis laboratorial [11].

Se digirieron aproximadamente 2 g de muestra de cada tejido con 5 ml de ácido nítrico (Suprapur grade Merck) y 2 ml de peróxido de hidrógeno 30% p/v en un sistema de microondas (Milestone, Ethos Plus). Las muestras digeridas se transfirieron a tubos de polipropileno y se diluyeron con agua ultrapura hasta 25 ml. Los niveles de elementos tóxicos y esenciales se determinaron mediante Espectroscopía de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES, Perkin Elmer Optima 4300 DV). Todos los elementos son analizados por medio de cámara de premezcla. Las líneas empleadas para cada elemento vienen especificadas en la Tabla 1, seleccionando las que no presentaban interferencias.

Durante el estudio se realizó un exhaustivo programa de control de calidad analítica. El límite de detección en la digestión ácida

se calculó como tres veces la desviación standard de los blancos partido la pendiente de la recta de calibrado (Tabla 1). Los límites de cuantificación, expresados como la concentración de cada analito en el tejido se calcularon teniendo en cuenta el peso de la muestra y la dilución empleada. Los estudios de recuperación analítica se llevaron a cabo empleando un material de referencia certificado (Pig Kidney CRM, BCR Reference Materials); en general, los valores determinados en este estudio son muy próximos a los valores certificados (Tabla 1). Como no se tenía información sobre los niveles presentes en el caso del Mo y Co en el material de referencia certificado, la recuperación analítica se realizó mediante el empleo de muestras añadidas de forma que se consiguiesen valores de absorbancia generalmente 2-10 veces por encima de los valores de concentración esperados en los tejidos; en todos los casos los valores de recuperación se situaron entre el 91 y 97%.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa SPSS para Windows (v. 12.0). Para calcular las concentraciones medias de cada elemento en los tejidos analizados, a las muestras con niveles por debajo del límite de detección se les asignó un valor igual a la mitad del límite de cuantificación. La distribución normal de los datos fue comprobada empleando la prueba de Kolgomorov-Smirnow. Varios de los elementos analizados, especialmente los elementos tóxicos, no presentaban una distribución normal incluso después de realizar una transformación logarítmica, por lo que las correlaciones entre los niveles de cobre y los elementos tóxicos y esenciales se realizaron empleando el coeficiente de correlación de Spearman (R_s).

Resultados y discusión

Las concentraciones de los elementos tóxicos y esenciales en hígado y riñón en ganado vacuno en nuestro estudio se presentan en la Tabla 2. En el hígado los niveles de cobre son muy elevados, lo que indica la gran capacidad de esta especie animal para almacenar cobre, siendo por tanto susceptible a la intoxicación crónica por cobre [12]. Se observó además que un número importante de animales presentaban niveles de cobre en hígado

Tabla 1. Límites de detección ($\mu\text{g/l}$) y resultados del análisis del material certificado de referencia (Pig Kidney CRM 186) expresado en mg/kg.

Elemento	Límite de detección	CRM(Pig Kidney CRM 186)*	
		Niveles certificados (media \pm 95%IC)	Niveles analizados (media \pm 95%IC)
As (188.979)*	17	0.063 \pm 0.009	< ld
Cd (214.440)	0,3	2.71 \pm 0.15	2.47 \pm 0.10
Co (228.616)	0,8	–	0.287 \pm 0.032
Cu (224.700)	3,5	31.9 \pm 0.4	29.6 \pm 0.3
Fe (238.204)	1,8	299 \pm 10	284 \pm 10
Hg (194.168)	5,4	1.97 \pm 0.04	1.76 \pm 0.05
Mn (257.610)	0,1	8.5 \pm 0.3	7.94 \pm 0.29
Pb (220.353)	0,2	0.306 \pm 0.011	0.329 \pm 0.053
Se (196.026)	6,1	10.3 \pm 0.5	11.0 \pm 0.5
Zn (202.548)	26	128 \pm 3	124 \pm 3

* Líneas de emisión para cada elemento.

Tabla 2. Niveles de elementos tóxicos ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso fresco) y esenciales (mg/kg peso fresco), cobalto ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso fresco) en hígado y riñón de ganado vacuno de la comarca del Deza.

	Cd	Pb	Cu	Mo	Fe	Se	Zn	Mn	Co
HÍGADO									
N(<LD)	195(34)	195(13)	195	195	195	195(147)	195	195	195
Media	13.9	156	89.6	1.39	43.6	0.215	53.9	3.45	69.6
Error típico de la media	0.867	4.7	3.9	0.016	0.779	0.012	0.918	0.048	1.81
Mediana	6.79	148	79.8	1.41	41.8	0.173	50.4	3.35	65.2
Mínimo	ND	ND	3.72	0.732	24.3	ND	33.7	1.69	ND
Máximo	86.5	509	382	2.004	90.2	0.852	115	5.509	187
RIÑÓN									
N(<LD)	195	195(155)	195	195	195	195	195	195	195(2)
Media	72.3	63.2	4.61	0.537	58.9	1.39	25.9	1.19	25.3
Error típico de la media	3.23	1.57	0.035	0.003	1.89	0.017	0.305	0.011	0.734
Mediana	59.7	59.7	4.61	0.539	54.9	1.38	24.9	1.203	25.6
Mínimo	ND	ND	3.52	0.385	23.4	0.766	18.8	0.696	ND
Máximo	328	233	5.92	0.730	287	2.086	50.7	1.73	58.4

ND: no detectado.

por encima de los descritos en otras zonas agrícolas [13-19]. En relación a los elementos tóxicos, todas las muestras presentaron niveles de arsénico y mercurio por debajo del límite de detección. Refiriéndonos al cadmio y al plomo, los niveles son bajos en comparación con otros estudios llevados a cabo en zonas agrícolas [10]. En cuanto al resto de elementos esenciales analizados, las mayores concentraciones se encuentran en el hígado, excepto para el hierro y el selenio donde el principal tejido de acumulación es el riñón; en general, los niveles medios de todos los oligoelementos estudiados se sitúan dentro de los rangos de normalidad descritos por Puls [20].

La Tabla 3 muestra las correlaciones existentes entre los niveles de cobre y elementos tóxicos y esenciales en este estudio. Al analizar las correlaciones entre el cobre y los elementos tóxicos se observó una fuerte asociación entre los niveles de cobre y plomo a nivel hepático ($R_s = 0.864$, $p = 0.000$). Esta asociación positiva podría ser debida a una exposición conjunta a ambos metales en el medio donde vive el animal, o bien a una interacción orgánica entre ambos. Al presentarse la asociación entre ambos metales sólo en hígado y no entre los niveles de cobre en hígado y plomo en riñón, junto al hecho de encontrar niveles medios de plomo en hígado muy superiores a los descritos en anteriores investigaciones en Galicia (156 frente a 53 $\mu\text{g}/\text{kg}$), podrían señalar que se trata de una interacción entre ambos metales a nivel orgánico, indicando que la exposición a niveles elevados de cobre favorece la deposición de plomo en este órgano. Existen varios ejemplos en la literatura científica referidos a la interacción entre plomo y cobre. En animales de laboratorio la administración de grandes cantidades de plomo en la dieta provoca una absorción deficiente de cobre [21] mientras que la adición de cobre a la dieta aumenta la acumulación de plomo [22]. En ganado vacuno, los resultados entre estudios no son coincidentes; mientras que en algunos trabajos se ha descrito una asociación negativa entre ambos elementos en animales expuestos a bajos niveles de plomo [8, 23], en otros se vio que no estaban asociados estadísticamente [24], o incluso, al igual que en nuestro estudio, ambos elementos presentan una fuerte

asociación positiva [5]. De todas formas, se desconocen los mecanismos de interacción de ambos metales a nivel orgánico.

En relación al cadmio, se ha observado una asociación negativa entre los niveles de cobre y el cadmio nivel hepático ($R_s = -0.145$; $p = 0.043$), de igual manera a nivel renal aunque sin alcanzar una significación estadística ($R_s = -0.118$, $p = 0.099$). Existen numerosos ejemplos en la literatura que muestran fuertes interacciones entre estos dos elementos. Así, en estudios experimentales en ganado vacuno y ovino a los que se les administró cadmio [25-27] o en animales que procedían de zonas contaminadas [23, 28], se observó una correlación negativa entre los niveles tisulares de ambos metales. Las altas concentraciones de cadmio dietético reducen la absorción de cobre, al inducir la síntesis de metalotioneínas a nivel intestinal las cuales atrapan al cobre impidiendo su absorción [29]. En nuestro estudio la exposición a cadmio es muy baja (como indica la concentración de residuo encontrada), mientras que los niveles de cobre son muy altos, por lo que no era de esperar un efecto significativo del cadmio sobre el estatus de cobre. Por el contrario, el alto nivel de exposición a cobre en la dieta podría tener un efecto en la reducción de los niveles de cadmio en los tejidos. Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta una competencia entre ambos metales en la absorción intestinal, que hace que los animales expuestos a niveles relativamente altos de cobre presenten una menor absorción de cadmio y por tanto una menor deposición tisular, especialmente en el riñón, el órgano que acumula la mayor concentración de cadmio-metalotioneínas tras niveles bajos de exposición crónica [30]. Al tratarse el cadmio de un elemento bioacumulativo, este efecto es poco marcado en animales jóvenes (como en nuestro caso) y es posible que aumente progresivamente con la edad.

En cuanto a los elementos esenciales, los niveles de cobre presentan una asociación estadística con la mayoría de los elementos estudiados, especialmente a nivel renal (Tabla 3). Estas asociaciones han sido descritas en estudios previos tanto en humana [31] como en ganado vacuno [5] con niveles de oligoelementos adecuados, lo que indica que se trata posiblemente de mecanismos homeostáticos de regulación mineral, de los que se des-

Tabla 3. Correlaciones entre los niveles de cobre y otros elementos tóxicos y esenciales en los terneros de nuestro estudio. Los valores representan el coeficiente de correlación de Spearman y la probabilidad (entre paréntesis).

	Cu		
	hígado-hígado	riñón-riñón	hígado-riñón
Cd	-0.145 (0.043)	-0.067 (0.349)	-0.118 (0.099)
Pb	0.864 (0.000)	0.116 (0.107)	0.003 (0.965)
Mo	0.416 (0.000)	0.638 (0.000)	0.070 (0.328)
Fe	-0.032 (0.662)	0.223 (0.002)	-0.274 (0.000)
Se	0.355 (0.000)	0.464 (0.000)	0.186 (0.000)
Zn	0.055 (0.446)	0.483 (0.000)	-0.130 (0.070)
Mn	0.263 (0.000)	0.439 (0.000)	-0.149 (0.038)
Co	0.405 (0.000)	0.272 (0.000)	0.360 (0.000)

conoce en la mayoría de los casos tanto los mecanismos implicados como su significación metabólica.

Aunque a nivel de la literatura científica hay descritos numerosos casos de interacción negativa entre los niveles de cobre y otros elementos como molibdeno, hierro y zinc [4, 9, 32], donde se ha demostrado que los niveles de estos elementos condicionan las necesidades de cobre, nuestros resultados indican que este no parece ser el caso, porque de ser así las interacciones entre los niveles de cobre y estos oligoelementos presentarían un carácter negativo. Mientras que la interacción entre cobre y selenio descrita en este estudio sí podría estar relacionada con el estatus de cobre de nuestros animales. Así, se ha demostrado a nivel experimental que niveles altos de cobre en la dieta inducen importantes cambios oxidativos que responden al selenio [33] debido al papel del enzima selenio dependiente glutatión peroxidasa en la eliminación de compuestos oxidativos. La interacción cobre-selenio descrita en nuestro estudio también podría explicarse teniendo en cuenta el papel del selenio en la inhibición de la síntesis de metalotioneínas [34], lo que dificultaría la excreción biliar de cobre, y por tanto una mayor acumulación a nivel hepático.

Finalmente, al analizar las interacciones de cobre y otros metales esenciales a nivel intertisular, se observa una correlación negativa entre los niveles de cobre hepático y la mayoría de elementos esenciales estudiados. Estos resultados son similares a los descritos con anterioridad en humana [31] y en ganado vacuno [5] en tejidos con niveles de oligoelementos adecuados, y podrían obedecer a mecanismos de regulación homeostática a nivel renal; si bien estudios recientes indican que estos elementos comparten proteínas transportadoras [35] todavía se desconoce cuál es la significación real de las mismas. En nuestro estudio los niveles de cobre a nivel renal se encuentran dentro de la

normalidad, por lo que estas correlaciones, al igual que en los estudios mencionados, deben valorarse en conjunto dentro de los mecanismos de regulación homeostática que presenta el animal.

Conclusiones

Los resultados de nuestro estudio indican que la exposición a niveles elevados de cobre en terneros en la Comarca del Deza da lugar a una mayor deposición de plomo a nivel hepático, así como a una tendencia a una menor acumulación de cadmio en el riñón. En cuanto a los elementos esenciales, el carácter positivo de las correlaciones encontradas entre cobre, molibdeno, hierro y zinc indica que, la exposición a niveles altos de cobre en nuestros animales no parece tener un efecto antagónico sobre dichos elementos directamente relacionados con el estatus y necesidades fisiológicas de cobre. Por el contrario, la asociación entre los niveles de cobre y selenio a nivel orgánico podría indicar un daño oxidativo en los animales expuestos a niveles altos de cobre, o de forma alternativa, un papel potenciador del selenio en la acumulación de cobre a nivel hepático.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por la Xunta de Galicia (proyecto PGIDT00AGR26102PR). Agradecemos a Maite Fernández la dedicación y colaboración profesional en el análisis laboratorial de las muestras del presente trabajo en investigación.

Bibliografía

1. Friberg L, Nordberg GF, Vouk VB (1979). Handbook on the toxicology of metals. Elsevier, Amsterdam. pp. 685.
2. Poulsen HD (1988). Zinc and copper as feed additives, growth factors or unwanted environmental factors. *J Anim Feed Sci* 7: 135-142.
3. Bires J, Dianovsky J, Bartko P, Jusanova Z (1995). Effects on enzymes and the genetic apparatus of sheep after administration of samples from industrial emissions. *BioMetals* 8: 53-58.
4. Underwood EJ, Suttle NF (2002). Los minerales en la nutrición del Ganado. (3ª ed) Editorial Acribia S.A. Zaragoza. pp. 287-348.
5. López Alonso M, Prieto Montaña F, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL (2004). Interactions between toxic (As, Cd, Hg and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain. *BioMetals* 17: 389-397.
6. Hart EB, Steenbock H, Waddell J, Elvehjem CA (1928). Iron in nutrition. 7 Copper as a supplement to iron haemoglobin building in the rat. *J Biol Chem* 77: 797-812.
7. Nicholson JK, Osborn D, Kendall MD (1984). Comparative distributions of zinc, cadmium and mercury in the tissues of experimental mice. *Comp Biochem Physiol* 77 (2): 249-256.
8. Spierenburg TJ, De Graaf GN, Baars AJ, Brus DHJ, Tielen MJM; Arts BJ (1988). Cadmium, zinc, lead and copper in livers and kidneys of cattle in the neighbourhood of zinc refineries. *Environ Monit Asses* 11: 107-114.
9. Igarza LM, Auza Y (1995). Molibdeno en rumiantes: aspectos fisiológicos y tóxicos. *Arch Med Vet* 27(1): 5-13.
10. López Alonso M, Benedito JL, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Shore RF (2000). Toxic and trace elements in liver, kidney and meta from cattle slaughtered in Galicia (NW Spain). *Food Addit Contam* 17: 447-457.

11. López Alonso M (1999). Estudio de los principales elementos contaminantes en ganado vacuno de Galicia. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
12. Charmley LL, Symonds HW (1985). A comparison of the ability of cattle and pigs to clear excess copper from the plasma and excrete it in bile. *Commonwealth Agriculture Bureau Scotland* 5: 339-341.
13. Kramer HL, Steiner JW, Vallely PJ (1983). Trace element concentration in the liver, kidney and muscle of Queensland cattle. *Bull Environ Contamin Toxicol* 30: 588-594.
14. Langlands JP, Donald GE, Bowles JE (1988). Cadmium concentrations in liver, kidney and muscle in Australian sheep and cattle. *Aust J Exp Agric* 28: 291-297.
15. Ellen G, Vanloon JW, Tolsma K (1989). Copper, chromium, manganese, nickel and zinc in kidney of cattle, pigs, and sheep and in chicken livers in Netherlands. *Z Lebensm Unters Forsch* 189 (6): 534-537.
16. Jorhem L, Sundstrom B, Astrand C, Haeggglund G (1989). The levels of zinc, copper, manganese, selenium, chromium, nickel, cobalt, and aluminium in the meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle. *Z Lebensm Unters Forsch* 188: 39-44.
17. Salisbury CDC, Chan W, Saschenbrecker P (1991). Multielement concentrations in liver and kidneys tissues from five species of Canadian slaughter animals. *J AOAC* 74 (4): 587-591.
18. Coleman ME, Elder RS, Basu P, Koppelaar G (1992). Trace elements in edible tissues of livestock and poultry. *J AOAC Int* 75 (4): 615-625.
19. Benemariya H, Robberecht H, Deelstra H (1993). Zinc, copper, and selenium in milk and organs of cow and goat from Burundi, Africa. *Sci Total Environ* 128: 83-98.
20. Puls R (1994). *Mineral Levels in Animal Health*. Sherpa International, Clearbrook.
21. Dhawan D, Singh B, Chand B, Singh N, Mangal PC (1995). X-ray fluorescence in the assessment of inter-elemental interaction in rat liver following lead treatment. *BioMetals* 8: 105-110.
22. Cerklowski FL, Forbes RM (1977). Influence of dietary copper on lead toxicity in the young male rat. *J Nutr* 107,143.
23. Miranda M (1999). Estudio de los principales elementos contaminantes en Ganado vacuno de Asturias. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
24. López Alonso M, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL (2002). Interacción entre metales tóxicos y esenciales en ganado vacuno de Galicia. *Rev Toxicol* 19: 73-76.
25. Wentink GH, Wensing T, Baars AJ, van Beek H, Zeeuwen AAPA, Schotman AJH (1988). Effects of cadmium on some clinical and biochemical measurements in heifers. *Bull Environ Contam Toxicol* 40: 131-138.
26. Smith RM, Griel LC, Muller LD, Leach RM, Baker DE (1991a). Effects of dietary cadmium chloride throughout gestation on blood and tissue metabolites of primigravid and neonatal dairy cattle. *J Anim Sci* 69: 4078-4087.
27. Smith RM, Leach RM, Muller LD, Griel LC, Baker DE (1991b). Effects of long-term dietary cadmium chloride on tissue milk and urine milk and urine mineral concentration lactating dairy cows. *J Anim Sci* 69: 4088-4096.
28. Koh TS, Judson GJ (1986). Trace elements in sheep grazing near a lead-zinc smelting complex at Port Pirie, South Australia. *Bull Environ Contam Toxicol* 37: 87-95.
29. Allen JD, Gawthorne JM (1987). Interactions between proteins, thiomolybdates and copper. *Proc. 6 th. Symp. Trace Elements in Man and Animals*. New York: Plenum. pp.315-316.
30. Dudley R, Gammal L, Klassen C (1985). Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 77: 414-426.
31. Rahil-Khazen R, Bolann BJ, Ulvik RJ (2002). Correlations of trace elements levels within and between different normal autopsy tissues analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *BioMetals* 15: 87-98.
32. Blalock TL, Dunn MA, Cousins RJ (1988). Metallothionein gene expression in rats: tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J Nutr* 118: 222-228.
33. Gawthorne JM (1987). Copper interactions. In "Copper in Man and Animals. vol. I. Eds J.M. Howell and J.M. Gawthorne. (CRC Press Inc.: Boca Raton, FL.). pp. 79-99.
34. Chmielnicka J, Bem EM, Kaszubski P (1983). Organ and subcellular distribution of cadmium in the rats exposed to cadmium, mercury and selenium. *Environ Res* 31: 266-272.
35. Garrick MD, Nuñez MT, Olivares M, Harris ED (2003). Parallels and contrasts between iron and copper metabolism. *BioMetals* 16 (1): 1-8.