

Modificaciones de los lípidos séricos de ratas suplementadas con cobre por vía oral

Oscar M. Alarcón-Corredor, Elizabeth Carnevalí de Tatá, José Reinos-Füller, Yaritza Contreras,
María Ramírez de Fernández y Claudia Yáñez-Domínguez

Facultad de Medicina y Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

RESUMEN. Los trastornos en el metabolismo de los lípidos durante la carencia de cobre en las ratas son muy conocidos. La deficiencia de Cu se asocia con la retención espontánea de hierro hepático. Estudios previos han informado que la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia están asociadas con concentraciones hepáticas elevadas de hierro en ratas carentes en Cu. Existe una relación directa entre la magnitud de los lípidos en la sangre y la concentración de hierro hepático. Basados en estos datos, se ha sugerido que el hierro es el responsable de la hiperlipemia de la carencia de Cu. En este estudio se determinó el efecto de dosis crecientes de Cu (10, 20 y 50 ppm) en la dieta, sobre el contenido sérico de lípidos totales, colesterol total, triglicéridos (triacylglicerols), fosfolípidos y ácidos grasos no esterificados (AGNE) y sobre el contenido hepático de Fe y Zn en ratas normales. Los resultados se compararon con los de ratas normales que recibieron una dieta equilibrada que contiene 0,6 y 6 ppm de Cu, respectivamente. Los resultados muestran que el suplemento de Cu disminuyó el nivel sérico de colesterol y de triglicéridos, aumentó el nivel de fosfolípidos y de AGNE y concomitantemente disminuyó las concentraciones hepáticas de Fe y Zn. Hubo una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre triglicéridos y Fe hepático ($r = 0,917$; $R^2 = 64,03\%$), colesterol y Zn hepático ($r = 0,872$; $R^2 = 76,07\%$), colesterol y Fe hepático ($r = 0,995$; $R^2 = 99,10\%$), Fe hepático y Cu hepático ($r = -0,612$), Fe y Zn en hígado ($r = 0,837$), Cu y Zn en hígado ($r = -0,612$), y triglicéridos y Zn hepático ($r = 0,967$). El mecanismo (s) por el cual el Fe y Zn determinan estos cambios no se conoce; ninguna de las enzimas que participan en el metabolismo y en la biosíntesis del colesterol y de los triglicéridos requieren de Fe y/o de Zn. El aumento de los AGNE probablemente se debe a los cambios en el proceso de lipólisis y re-esterificación de los ácidos grasos en la sangre. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para esclarecer los mecanismos precisos de estas interrelaciones.

Palabras clave: Cobre, metabolismo de los lípidos, colesterol sérico, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados, hierro hepático, cinc hepático.

INTRODUCCION

El cobre (Cu) como parte integrante de numerosas cuproenzimas y cuproproteínas se considera un micronutriente esencial en diversos procesos fisiológicos y metabólicos que comprometen, entre otros, el desarrollo y el mantenimiento de

SUMMARY. Changes in serum lipids in rats treated with copper.

Disturbances in lipid metabolism during copper deficiency in rats are well recognized. Copper deficiency is associated with the spontaneous retention of hepatic iron. Previous studies have reported that hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia are associated with elevated hepatic iron concentrations in copper deficient rats. There was a direct relationship between the magnitude of blood lipids and the concentration of hepatic iron. Based on these data, it has been hypothesized that iron was responsible for the development of lipemia of copper deficiency. In this study was determined the effect of increasing doses of Cu (10, 20 and 50 ppm) in the diet, on the serum total lipids, total cholesterol, triglycerides (triacylglycerols), phospholipids, non-esterified fatty acids (NEFA) and liver iron and zinc concentrations in normal rats. The results were compared with normal rats that received a balanced diet containing 0,6 and 6 ppm of Cu, respectively. The results show that Cu-supplement diminished the cholesterol and triglyceride serum levels, increased the level of phospholipids, NEFA and concomitantly decreased the hepatic concentrations of Fe and Zn. There was a statistically significant ($p < 0.05$) simple correlation between triglycerides and liver Fe ($r = 0,917$; $R^2 = 64,03\%$), cholesterol and liver Zn ($r = 0,872$; $R^2 = 76,07\%$), cholesterol and liver Fe ($r = 0,995$; $R^2 = 99,10\%$), liver Fe and liver Cu ($r = -0,612$), liver Fe and liver Zn ($r = 0,837$), liver Cu and liver Zn ($r = -0,612$), and serum triglycerides and liver Zn ($r = 0,967$). The mechanism (s) by which Fe and Zn determine these changes is not known; none of the enzymes that act in cholesterol and triglyceride metabolism and biosynthesis require Fe and/or Zn. The increase of NEFA is due to changes in the process of lipolysis and re-esterification of the fatty acids in blood. However, additional studies are needed for the precise mechanisms of this interrelationships to be clarified.

Kew words: Copper, lipid metabolism, serum cholesterol, triglycerides, phospholipids, non-esterified fatty acids, liver iron, liver zinc.

la integridad cardiovascular y ósea, la estructura y función del sistema nervioso central y la función eritropoyética, conjuntamente con el metabolismo del hierro (1).

La importancia bioquímica del cobre se conoce desde las investigaciones nutricionales realizadas en 1928. Sin embargo, a pesar de ciertos hallazgos en la década de los años 30, su

carencia en los humanos sólo se consideró de interés práctico a partir de los estudios realizados por Cordano y cols. (2), en lactantes y en niños peruanos desnutridos. La carencia de cobre no se consideró en el pasado un problema, debido a su amplia distribución en los renglones alimenticios que entran a formar parte de la mayoría de las dietas, en todo el mundo. Por otra parte, sus requerimientos diarios estimados son muy bajos. Sin embargo, en la actualidad se considera que en el humano puede presentarse, y de hecho sucede, la carencia de cobre (3). Aunque, la importancia y la intensidad del problema, al igual que la naturaleza y la frecuencia de las carencias moderadas, es algo que se debe aclarar.

La deficiencia de cobre es fundamentalmente una patología de los infantes; sin embargo, también se han descrito casos en niños y adultos. Esta puede ser el resultado de un ingreso alimentario inadecuado, de un proceso de mala-absorción, de requerimientos incrementados o de un incremento de las pérdidas corporales (4). Sus manifestaciones clínicas más constantes son anemia, neutropenia y lesiones óseas (5).

En los animales experimentales y en el hombre la carencia de cobre determina trastornos del metabolismo de los lípidos y la hiperlipemia se acompaña de modificaciones en el perfil lipoproteico (6-9). En la rata, la hipercolesterolemia se ha convertido en un síntoma clásico de la carencia nutricional de este elemento traza esencial (10).

En sujetos alimentados con una dieta experimental baja en cobre se ha observado un incremento en la concentración sérica del colesterol total y del colesterol:LDL y una concentración reducida del colesterol:HDL (11,12). Todas estas alteraciones son factores de riesgo muy bien conocidos para el desarrollo de la aterosclerosis (13,14). Sin embargo, otros experimentos no han reproducido estos cambios en el metabolismo del colesterol y de la glucosa (15).

Los trabajos de Williams y cols. (16) indican que la deficiencia de cobre está asociada con la retención espontánea de hierro hepático. Recientemente se ha señalado, en ratas, que la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia están asociadas con concentraciones hepáticas elevadas de hierro (17), demostrándose una relación directa entre la magnitud de los lípidos de la sangre y la concentración del hierro hepático. Basado en estos datos, se ha sugerido que el hierro es el responsable para el desarrollo de la lipemia en la deficiencia de cobre. Los trabajos recientes de Fields y Lewis (18) sugieren que los nutrientes que tienen la capacidad de incrementar el hierro hepático tienen el potencial para incrementar el colesterol plasmático.

En base a estos hallazgos previos el motivo de la presente investigación fue estudiar el efecto de las dosis crecientes de cobre (10, 20 y 50 ppm Cu/kg de dieta) por vía oral sobre el contenido hepático de hierro y de cinc , y sobre el contenido sérico de lípidos totales, de colesterol total, de triglicéridos, de fosfolípidos y de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en ratas macho blancas (Grupos experimentales) y comparar con lo que sucede en ratas alimentadas con dietas balanceadas que

contienen 0,6 y 6 ppm de Cu/kg, respectivamente (Grupos testigos).

MATERIALES Y METODOS

Animales y dieta

Se utilizaron 100 ratas blancas macho Wistar, de edad y peso uniforme (160-170 g) mantenidas en jaulas individuales de acero inoxidable, en el ambiente del Laboratorio, durante dos semanas, para las adaptaciones correspondientes. Se controló la temperatura y la humedad del cuarto a 23-25°C y 55-67%, respectivamente. Todas las ratas se alimentaron con una dieta basal de acuerdo con las recomendaciones del American Institute of Nutrition (19) formulada en nuestro Laboratorio para omitir el carbonato de cobre. La dieta, que no contiene colesterol, está constituida por una mezcla de sacarosa (62% por peso), clara de huevo (20%) y aceite de maíz (10%) con un nivel deficiente de cobre (0,6 ppm). Además la dieta contiene todos los nutrientes considerados esenciales para la rata, incluyendo 2 mg de biotina; el contenido de cobre de la misma se determinó después de la destrucción de la materia orgánica. Las ratas se alimentaron *ad libitum* y se les permitió el libre acceso al agua bidestilada y desionizada. La concentración de Cu en el agua desionizada estaba por debajo de los límites de detección del elemento (0,002 $\mu\text{g/mL}$) por el espectrofotómetro de absorción atómica empleado.

Diseño experimental

Al terminar el período de adaptación, las ratas con un peso promedio de 182 ± 9 g se distribuyeron al azar en 5 grupos, con 20 animales en cada uno, sin que hubiese diferencias significativas entre los promedios de los pesos de los mismos: 1) grupo deficiente en cobre (CuD) alimentado *ad libitum* con 0,6 ppm de Cu; 2) un grupo control alimentado *ad libitum* con 6 ppm de Cu/kg de dieta (CuA); 3) un grupo alimentado a la par, al cual se le suministró la dieta basal suplementada con 10 ppm de Cu (Cu10); 4) un grupo alimentado a la par, al cual se le suministró la dieta basal suplementada con 20 ppm de Cu (Cu20) y 5) un grupo alimentado a la par, al cual se le suministró la dieta basal suplementada con 50 ppm de Cu (Cu50) (Grupos experimentales). Las ratas de estos grupos fueron alimentadas diariamente con la misma cantidad de alimento consumida por las ratas control (CuA). El carbonato de cobre (Merck) se añadió a la dieta basal (0,6 ppm) para proporcionar las concentraciones de 6, 10, 20 y 50 ppm/kg de dieta.

Recolección de las muestras

Al comienzo de los experimentos, luego de un periodo de ayuno de 8 horas, las muestras de sangre (3 mL) se extrajeron por vía del seno retroorbitario bajo anestesia con éter dietílico (Merck) y tubos de microhematocrito. 1.5 mL de sangre se recolectaron en tubos de vidrio sin anticoagulante, el suero se separó mediante centrifugación a 1,000 g por 15 min a tempe-

ratura ambiente y se analizó antes de las 48 horas. La sangre restante (1.5 mL) se recolectó en tubos que contenían heparina y el plasma se separó por centrifugación.

Al finalizar el periodo de 6 semanas, una vez que las muestras de sangre se obtuvieron, los animales se sacrificaron y el hígado se removió rápidamente, se le eliminó la grasa y el tejido conectivo y se pesó. El cobre, de la dieta y del hígado, y el cinc y el hierro, del tejido hepático, fueron extraídos de las muestras de acuerdo al método descrito por Burguera y cols. (20). Se analizaron muestras por duplicado utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica equipado con un corrector de ruido de doble haz y un microprocesador. Las concentraciones séricas de colesterol y de acilglicéridos (triglicéridos) se determinaron mediante métodos enzimáticos descritos previamente (21,22), mientras que los lípidos totales fueron determinados por el método de Aiquel (23). Los fosfolípidos se estimaron de acuerdo al método de O'Brien y cols. (24) y los niveles plasmáticos de los ácidos grasos no esterificados (AGNE) con la técnica descrita por Ióvine y cols. (25).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de regresión lineal y ANOVA de una vía. El test de Duncan de rango múltiple se utilizó para comparar los promedios de los 5 grupos (CuD, CuA, Cu10, Cu20 y Cu50). Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico Statgrafic 2.0 para Win. Todos los datos se expresaron como medias \pm DE. La diferencia significativa entre los grupos al inicio y al final del experimento se calculó mediante la t de Student. El nivel de significación estadística se determinó a $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados de comparar los valores de los lípidos séricos al inicio (0 días) y al final (6 semanas) del periodo experimental se muestran en las Tablas 1 a 5. La Tabla 1 muestra los niveles totales de lípidos séricos de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre. Se observa que en las ratas suplementadas con Cu, la lipemia se incrementa significativamente ($p < 0,05$) al finalizar las 6 semanas. El análisis estadístico (t de Student) demostró variaciones significativas ($p < 0,05$) al comparar los valores de los mismos al inicio (0 días) con los de las 6 semanas; el ANOVA ($F = 980$; $GL = 1/3$; $p > 0,05$) demostró diferencias estadísticamente significativas al comparar los promedios de la lipemia de los diferentes grupos de animales al finalizar el periodo experimental.

Los resultados obtenidos del modelo de regresión simple ($y = a + b \cdot X$, donde $X =$ dosis de cobre) para describir la relación entre los valores de la lipemia al final del experimento (6 semanas) y las dosis suministradas de cobre con la dieta se indican a continuación: $y = 245,5555 + 1,31899 \cdot \text{dosis}$; $r = 0,954$ y $R^2 = 90,94\%$. El valor del estadístico R^2 indica que el

modelo como se ajustó explica el 90,94% de la variabilidad de los valores de la lipemia, al cabo de 6 semanas de tratamiento. El coeficiente de correlación (r) igual a 0,954 indica que existe una relación relativamente fuerte y directamente proporcional entre las variables; es decir, que el incremento en los niveles totales de los lípidos séricos a las 6 semanas de tratamiento es directamente proporcional a las dosis de cobre.

TABLA 1

Niveles totales de lípidos séricos de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre

Dieta	Lípidos totales (mg/dL)		p^a
	0 días	6 semanas	
CuD	233 \pm 19	250 \pm 18	ns
CuA	235 \pm 27	240 \pm 19	ns
Cu10	221 \pm 14	266 \pm 22	<0,05
Cu20	225 \pm 23	276 \pm 14	<0,05
Cu50	230 \pm 18	310 \pm 25	<0,05
	ns	$p < 0,05^b$	

Los resultados se expresan en medias \pm DE.

^a $p < 0,05$ estadísticamente significativo al comparar 0 días y 6 semanas. ^b $p < 0,05$ estadísticamente significativo al comparar los promedios de los diferentes grupos. ns= no significativo. CuD= Dieta deficiente en cobre (0,6 ppm). CuA= Dieta adecuada en cobre (6 ppm); Cu10= Dieta suplementada con 10 ppm de cobre/kg. Cu20= Dieta suplementada con 20 ppm de cobre. Cu50= Dieta suplementada con 50 ppm de cobre.

En la Tabla 2 se muestran los niveles de triglicéridos séricos de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre. El análisis estadístico (t de Student) mostró variaciones significativas en los valores de estos compuestos (0 días y 6 semanas) al comparar la dieta deficiente en cobre con las dietas suplementadas con 20 y 50 ppm de Cu, respectivamente. En este caso se observa que el suplemento de cobre determina una disminución significativa, ($p < 0,05$) en los niveles de triglicéridos séricos al finalizar el periodo experimental. Al igual que lo que sucede con la lipemia, el ANOVA ($F = 995$; $GL = 1/3$; $p > 0,05$) demostró diferencias estadísticamente significativas al comparar los promedios de los triglicéridos de los diferentes grupos de animales al finalizar el periodo experimental.

La ecuación del modelo de regresión lineal para los triglicéridos fue $y = 77,9304 - 0,550256 \cdot \text{dosis}$; el valor $r = -0,774$ y el valor del estadístico $R^2 = 59,86\%$. El valor del estadístico R^2 indica que el modelo explica el 59,86% de la variabilidad de los valores de los triglicéridos al cabo de 6 semanas de tratamiento. El coeficiente de correlación (r) igual a -0,774 indica que existe una relación moderadamente fuerte e inversamente proporcional entre las variables; por esta razón, la disminución en los niveles séricos de los triglicéridos a las 6 semanas de tratamiento es directamente proporcional a las dosis de cobre administradas.

TABLA 2
Niveles de triglicéridos séricos de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre

Dieta	Triglicéridos (mg/dL)		p ^a
	0 días	6 semanas	
CuD	72±8	90±8	<0,05
CuA	71±7	74±9	ns
Cu10	71±6	63±9	ns
Cu20	72±4	60±8	<0,05
Cu50	73±8	55±9	<0,05
	ns	p<0,05 ^b	

Los resultados se expresan en medias±DE.

^ap<0,05 estadísticamente significativo al comparar 0 días y 6 semanas. ^bp<0,05 estadísticamente significativo al comparar los promedios de los diferentes grupos. Resto de la leyenda igual a la Tabla 1.

En la Tabla 3 se observa que los niveles de colesterol sérico de ratas sometidas a una dieta deficiente de cobre están incrementados (p<0,05) en comparación con las ratas que reciben la dieta que contiene una cantidad adecuada del micronutriente; las dietas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre disminuyen significativamente (p<0,05) la colesterolemia, al finalizar el periodo de 6 semanas. La t de Student mostró variaciones significativas en los valores de estos compuestos (0 días y 6 semanas) al comparar la dieta deficiente en cobre con las dietas suplementadas con 10, 20 y 50 ppm de Cu, respectivamente.

TABLA 3
Niveles de colesterol sérico de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre

Dieta	Colesterol (mg/dL)		p ^a
	0 días	6 semanas	
CuD	41±9	114±18	<0,05
CuA	41±7	42±6	ns
Cu10	41±8	30±8	<0,05
Cu20	42±9	27±7	<0,05
Cu50	43±9	21±6	<0,05
	ns	p<0,05 ^b	

Los resultados se expresan en medias±DE.

^ap<0,05 estadísticamente significativo al comparar 0 días y 6 semanas. ^bp<0,05 estadísticamente significativo al comparar los promedios de los diferentes grupos. Resto de la leyenda igual a la Tabla 1.

La ecuación del modelo de regresión lineal para el colesterol fue $y = 67,5698 - 1,19918 * \text{dosis}$; el valor $r = -0,613$ y el valor del $R^2 = 37,58\%$. El valor del estadístico R^2 indica que el modelo explica el 37,58% de la variabilidad de los valores del colesterol al cabo de 6 semanas de tratamiento. El coeficiente de correlación (r) igual a $-0,613$, indica que existe una relación moderadamente fuerte e inversamente proporcional entre las

variables; en consecuencia, la disminución en los niveles séricos del colesterol a las 6 semanas de tratamiento es directamente proporcional a las dosis de cobre administradas.

La Tabla 4 muestra los niveles de fosfolípidos séricos de ratas con una dieta deficiente en cobre, una dieta con un nivel adecuado de Cu y con dietas suplementadas con diferentes concentraciones del micronutriente. El análisis estadístico (t de Student) mostró variaciones significativas en los valores de estos compuestos (0 días y 6 semanas) al comparar la dieta deficiente en cobre con las dietas suplementadas con 10, 20 y 50 ppm de Cu, respectivamente. En este caso se observa que el suplemento de cobre determina un incremento significativo (p<0,05) en los niveles de fosfolípidos séricos al finalizar el periodo experimental. Al igual que lo que sucede con las otras fracciones lipídicas, el ANOVA (F= 873; GL= 1/3; p>0,05) demostró diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores al inicio y al final del periodo experimental.

TABLA 4
Niveles de fosfolípidos séricos en ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre

Dieta	Fosfolípidos (mg/dL)		p ^a
	0 días	6 semanas	
CuD	105±20	95±9	ns
CuA	104±23	106±18	ns
Cu10	195±22	156±20	<0,05
Cu20	104±21	160±13	<0,05
Cu50	103±20	165±23	<0,05
	ns	p<0,05 ^b	

Los resultados se expresan en medias±DE.

^ap<0,05 estadísticamente significativo al comparar 0 días y 6 semanas. ^bp<0,05 estadísticamente significativo al comparar los promedios de los diferentes grupos. Resto de la leyenda igual a la Tabla 1.

La ecuación del modelo de regresión lineal para los fosfolípidos fue $y = 115,086 + 1,2306 * \text{dosis}$; el valor $r = 0,727$ y el valor del $R^2 = 52,92\%$. El valor del estadístico R^2 indica que el modelo explica el 52,92% de la variabilidad de los valores de los fosfolípidos al cabo de 6 semanas de tratamiento. El coeficiente de correlación (r) igual a $0,727$ indica que existe una relación moderadamente fuerte y directamente proporcional entre las variables; en consecuencia, el incremento en los niveles séricos del colesterol a las 6 semanas de tratamiento es directamente proporcional a las dosis de cobre administradas.

Los niveles de ácidos grasos no esterificados (AGNE) séricos de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre se muestran en la Tabla 5. El análisis estadístico (t de Student) mostró variaciones significativas en los valores de estos compuestos (0 días y 6 semanas) al comparar la dieta deficiente en cobre con las dietas suplementadas con 10, 20 y 50 ppm de Cu, respectivamente. En este caso se observa que el suplemento de cobre determina un incremento significativo (p<0,05) en los

niveles de AGNE séricos al finalizar el periodo experimental. Al igual que lo que sucede con la lipemia, el ANOVA ($F= 1010$; $GL= 1/3$; $p>0,05$) demostró diferencias estadísticamente significativas al comparar los promedios de los AGNE de los diferentes grupos de animales al finalizar el periodo experimental.

TABLA 5

Niveles de ácidos grasos no esterificados (AGNE) séricos de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre

Dieta	AGNE (mEq/L)		p ^a
	0 días	6 semanas	
CuD	225±33	180±23	<0,05
CuA	230±30	231±25	ns
Cu10	228±27	762±21	<0,05
Cu20	228±25	780±30	<0,05
Cu50	230±30	812±22	<0,05
	ns	p<0,05 ^b	

Los resultados se expresan en medias±DE.

^ap<0,05 estadísticamente significativo al comparar 0 días y 6 semanas. ^bp<0,05 estadísticamente significativo al comparar los promedios de los diferentes grupos. Resto de la leyenda igual a la Tabla 1.

La ecuación del modelo de regresión lineal para los AGNE fue $y = 356,581 + 11,3406 * \text{dosis}$; $r = 0,698$ y $R^2 = 48,78\%$. El valor del estadístico R^2 indica que el modelo explica el 48,78% de la variabilidad de los valores de los AGNE al cabo de 6 semanas de tratamiento. El coeficiente de correlación (r) igual a 0,698 indica que existe una relación moderadamente fuerte entre las variables; por esta razón, el incremento en los niveles séricos de los AGNE a las 6 semanas de tratamiento es directamente proporcional a las dosis de cobre administradas.

Las modificaciones del contenido de cobre ($y = 2,33717 + 0,312288 * \text{dosis}$; $r = 0,996$; $R^2 = 99,12\%$) y del cinc ($y = 45,5736 - 0,391084 * \text{dosis}$; $r = -0,838$; $R^2 = 70,19\%$) se muestran en las Tablas 6 y 7, respectivamente.

TABLA 6

Contenido de cobre hepático de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre

Dieta	Cobre hepático (µg/g de tejido húmedo) 6 semanas
CuD	2,03±0.30
CuA	4,40±0.40
Cu10	6,30±0.31
Cu20	8,00±0.52
Cu50	10,0±0.81
	p<0,05 ^a

Los resultados se expresan en medias±DE.

^ap<0,05 estadísticamente significativo al comparar los promedios de los diferentes grupos. Resto de la leyenda igual a la Tabla 1.

TABLA 7

Contenido de cinc hepático de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre

Dieta	Cinc hepático (µg/g de tejido húmedo) 6 semanas
CuD	52±8
CuA	43±7
Cu10	38±9
Cu20	30±6
Cu50	26±6
	p<0,05 ^a

Los resultados se expresan en medias±DE.

^ap<0,05 estadísticamente significativo al comparar los promedios de los diferentes grupos. Resto de la leyenda igual a la Tabla 1.

TABLA 8

Contenido de hierro hepático de ratas suplementadas con diferentes concentraciones de cobre

Dieta	Hierro hepático (µg/g de tejido húmedo) 6 semanas
CuD	150±10
CuA	54±3
Cu10	50±2
Cu20	45±4
Cu50	39±3
	p<0,05 ^A

Los resultados se expresan en medias±DE.

^ap<0,05 estadísticamente significativo al comparar los promedios de los diferentes grupos. Resto de la leyenda igual a la Tabla 1.

El análisis de regresión simple demostró una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el contenido de cinc hepático y los lípidos séricos ($r = -0,855$), hierro y cobre hepático ($r = -0,612$), triacilglicérols (triglicéridos) y concentración de hierro hepático ($r = 0,917$; $R^2 = 84,03\%$), cinc hepático y colesterol sérico ($r = 0,872$), hierro hepático y colesterolemia ($r = 0,995$; $R^2 = 99,09\%$), contenido de hierro y de cinc hepático (0,837), contenido de cobre y de cinc hepático ($r = -0,612$), triacilglicérols (triglicéridos) y cinc hepático ($r = 0,967$), colesterol sérico y contenido de cobre en hígado ($r = -0,651$).

DISCUSION

En las ratas carentes en cobre encontramos hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, que se corresponde con los hallazgos de otros investigadores (26-29). Por su parte, Milne y Nielsen (30) en mujeres postmenopáusicas sometidas a una dieta que contenía 9 mol (0,57 mg) Cu/día durante 105 días concluyeron que los ingresos bajos en este

micronutriente no inducen los cambios en el colesterol sérico que generalmente se encuentran en los modelos animales deficientes en cobre.

En los animales carentes en cobre también se encontró un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de Zn y de Fe, que coincide con los trabajos previos de Williams y cols. (16) de Fields y Lewis (31) y de Mason (32). Recientemente, Fields y Lewis (33) han sugerido que los nutrientes que tienen la capacidad de incrementar el hierro hepático tienen el potencial para incrementar el colesterol plasmático.

El mecanismo responsable para la hipercolesterolemia cuando el hierro hepático está elevado no se entiende totalmente. Ninguna de las enzimas que participan en la biosíntesis del colesterol requiere hierro. Aunque no hay información en la literatura que una al hierro con el colesterol de la sangre, hay estudios que atribuyen la anemia de la deficiencia férrica a la lipogénesis (34-37).

La administración de Cu produce hiperlipidemia, caracterizada por un incremento en los fosfolípidos y en los AGNE séricos. Aique (23) ha señalado que las hiperlipidemias se caracterizan por el aumento de una, de varias o de todas las fracciones lipídicas del plasma, pudiendo acompañarse o no de manifestaciones clínicas (xantomas, xantelasma, lipemia retinal, etc.). Con las dosis de Cu administradas se debe producir un cambio importante en ciertos lípidos que no se determinaron en este estudio, entre los cuales encontramos las lipoproteínas, la lecitina y otros derivados lipídicos presentes en cantidades menores que serán objeto de estudios futuros.

El hallazgo más característico de la presente investigación es la disminución significativa de los niveles séricos del colesterol y de los triglicéridos en los animales tratados con dosis crecientes de cobre. Estos resultados concuerdan con los de Singh y cols. (38) quienes demostraron que el consumo incrementado de cobre (promedio 5.2 mg/día) se asocia con una disminución significativa en el colesterol sérico (7.2%) y en los triglicéridos (9.1%) en comparación con los niveles iniciales del paciente y con el grupo control. Cada mg de ingreso de cobre alimentario se asocia con una disminución del colesterol sérico total en 3.3 mg y de 2.8 mg para los triglicéridos y están en contradicción con las observaciones previas de Jones y cols (39) y de Medeiros y cols. (40) quienes en dos estudios doble ciego, de dos semanas de duración, evaluaron los efectos de los suplementos de 2 ó 3 mg Cu/día sobre el colesterol sérico total y las fracciones colesterol-lipoproteínas en hombres adultos y concluyeron que los efectos de la suplementación con Cu requieren de una investigación ulterior. Sin embargo, Anke (41) ha señalado que tanto la carencia de cobre como su abundancia puede incrementar el contenido de colesterol del suero sanguíneo.

El mecanismo exacto mediante el cual el suplemento alimentario de cobre reduce el colesterol y los triglicéridos séricos se desconoce. Con 50 ppm de Cu los cambios en los lípidos séricos pueden ser causados indirectamente por la carencia documentada de cinc (Zn) y por la disminución del

contenido hepático de hierro determinadas por las dosis elevadas de Cu que pueden afectar la biodisponibilidad de los mismos. Las interacciones entre estos metales han sido reconocidas en animales y en el hombre. La competencia por los sitios de unión/deposición con las metalotioneínas parece proporcionar la mejor explicación para el proceso (42,43).

Es un hecho conocido que la hipocolesterolemia se produce en cerdos, ratas y humanos por la carencia de Zn (44). En la rata, la carencia de cinc determina un incremento en la excreción hepática de ácidos biliares (45). Una declinación lineal en el colesterol plasmático se encontró en dos hombres durante un periodo de privación de (46). En un estudio previo, Koo y cols (47) en ratas macho adultas, demostraron que la hipocolesterolemia desarrollada en la carencia de cinc se debe a una disminución selectiva en el colesterol-HDL. Este caso, la carencia de Zn en ratas, inclusive a un nivel marginal, produce alteraciones significativas en el nivel y en la composición de las HDL plasmáticas en ratas; estos cambios pueden afectar adversamente el metabolismo y el transporte del colesterol (48).

Los trabajos previos de Fields y Lewis (33), que se corresponden con los de la presente investigación, demuestran la relación inversa entre la colesterolemia y los niveles hepáticos de hierro.

En relación con los fosfolípidos, los trabajos previos de Gallagher y cols. (49) han señalado que el cobre está involucrado en la formación de los ácidos fosfatídicos, componentes muy importantes de los fosfolípidos, y que las lesiones causadas por la desmielinización descritas en las ratas carentes de cobre se deben a una alteración en la síntesis de los fosfolípidos. Cunnane y cols. (50) demostraron que la concentración total de fosfolípidos era menor en hígado y riñón de ratones deficientes en cobre en comparación con ratones control alimentados con una dieta adecuada en el metal. Por consiguiente, nuestros resultados que demuestran un incremento en los niveles séricos de los fosfolípidos séricos sugieren que la administración de cobre estimula la síntesis de estos compuestos. El mecanismo que explica este incremento deberá ser estudiado en investigaciones posteriores.

En relación a los AGNE, nuestros resultados contradicen los de Myres y Bowland (51,52). Sin embargo, niveles séricos elevados de cobre se han asociado con un incremento en el nivel de los ácidos grasos no esterificados plasmáticos en el hombre (53). Este resultado pudiera estar relacionado con una alteración en el balance entre la lipólisis y la reesterificación de los ácidos grasos. Cunnane y cols. (54) encontraron que las ratas carentes en cobre tienen perfiles plasmáticos, hepáticos y cardíacos alterados de ácidos grasos. Observaciones iniciales han demostrado que el Cu alimentario determina un incremento del contenido de los ácidos grasos insaturados de los triglicéridos y de los ácidos grasos libres (AGL) en el tejido adiposo porcino (52). El experimento realizado por Bowland y Myers (52) no proporciona ninguna prueba para un efecto del Cu sobre el nivel de los AGL plasmáticos a pesar de que

la concentración total de estos ácidos es menor en cerdos suplementados con este metal.

En conclusión, este es uno de los primeros trabajos que en nuestro medio examina los efectos de los ingresos elevados de Cu sobre los lípidos séricos. Los resultados obtenidos demuestran que la administración de cobre, a las dosis de 10 a 50 ppm/kg de dieta, disminuye significativamente la concentración hepática de Zn y de Fe, la colesterolemia y la trigliceridemia e incrementa concomitantemente los niveles séricos de fosfolípidos y de AGNE.

Bajo las condiciones experimentales presentadas, los datos muestran que el contenido de hierro y de cinc en el hígado puede jugar un papel importante para determinar la hipercolesterolemia. Debe señalarse que es necesario cierta precaución que garantice la interpretación de estos datos. Sherman (55) no observó las elevaciones en el colesterol del suero por las carencias de cobre y de hierro en las ratas hembra.

El presente estudio es importante ya que una gran parte de nuestra población usa suplementos con hierro y multivitaminas que contienen hierro, y existe el uso extendido de la fortificación con hierro. Los niveles férricos elevados en los depósitos pudiera ser de importancia en la patogénesis de la enfermedad cardíaca coronaria. Recientes estudios epidemiológicos en humanos proporcionan la evidencia de que los depósitos corporales de hierro son un factor de riesgo potencial para el infarto agudo del miocardio (56,57).

REFERENCIAS

- Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996;63: 797S-811S.
- Cordano A, Baert JM, Graham GG. Copper deficiency in infancy. *Pediatrics* 1964;34: 324-336.
- Heller RM, Kirchner SG, O'Neill JA Jr, Hough AJ Jr, Howard L, Kramer SS, Green HL. Skeletal changes of copper deficiency in infants receiving prolonged total parenteral nutrition. *J Pediatr* 1978;92:947-949.
- Olivares M, Uauy R. Copper as essential nutrient. *Am J Clin Nutr* 1996;63: 791S-785S.
- Shaw JCL. Copper deficiency in term and preterm infants. In: Fomon SJ, Zlotkin S. eds. *Nutritional anemias*. Nestlé Nutrition Workshop Series. Vol 30, New York: Raven Press. 1992;pp. 105-119.
- Allen KGD, Klevay LM. Copper: an antioxidant nutrient for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:22-28.
- Rayssiguier Y, Gueux E, Bussiere L, Mazur A. Copper deficiency increases the susceptibility of lipoproteins and tissues to peroxidation in rats. *J Nutr*. 1993;123:1343-1348.
- Nassir F, Mazur A, Serougne C, Gueux E, Rayssiguier Y. Hepatic apolipoprotein B synthesis in copper-deficient rats. *FEBS Lett*. 1993;322: 33-36.
- al-Othman AA, Rosenstein F, Lei-KY. Pool size and concentration of plasma cholesterol are increased and tissue copper levels are reduced during early stages of copper deficiency in rats. *J Nutr* 1994;124: 628-635.
- Medeiros DM. The copper:zinc hypothesis and cardiovascular disease. *Biochem Arch* 1985;1: 67-73.
- Klevay LM, Inman L, Johnson LK, Lawler M, Mahalko JR, Milne DB, Lukaski HC, Bolonchuk W, Sandstead HH. Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion. *Metabolism* 1984;33: 1112-1118.
- Reiser S, Powell A, Yang CY, Canary JJ. Effect of copper intake on blood cholesterol and its lipoprotein distribution in men. *Nutr Rep Int* 1987;36: 641-649.
- Klevay LM (2000) Dietary copper and risk of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 71: 1213-1214.
- Klevay LM. Cardiovascular disease from copper deficiency—a history. *J Nutr* 2000;130 (2S Suppl):489S-492S.
- Kelley DS, Daudu PA, Taylor PC, Mackey BE, Turlund JR. Effects of low-copper diets on human immune response. *Am J Clin Nutr* 1995;62: 412-416.
- Williams DM, Kennedy FS, Green BG. Hepatic iron accumulation in copper-deficient rats. *Br J Nutr* 1983;50: 653-660.
- Fields M, Lewis CG. Hepatic iron overload may contribute to hypertriglyceridemia and hipercolesterolemia in copper-deficient rats. *Metabolism* 1997;46: 377-381.
- Fields M, Lewis CG. Cholesterol-lowering nature of insaturated fat in rats may be due to its inability to increase hepatic iron. *Metabolismo* 1999;48: 200-204.
- American Institute of Nutrition. Report of the AIN Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1977;107:1340-1348.
- Burguera JL, Burguera M, Matousek de Abel de La Cruz A, Añez N, Alarcón OM. Microwave-aided micro-dissolution of biological samples prior to flow injection-atomic absorption spectrometry analysis. *At Spectr* 1992;13: 67-71.
- Allain CC, Poon LS, Chan CSG. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;2: 470-475.
- Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973;19:476-482.
- Aiquel Aiquel F. *Manual de Análisis Clínicos*. 4a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; 1977;pp. 154-155.
- O'Brien D, Ibbott FA, Rodgerson DD (1968) Determination of plasma inorganic phosphorus, tubular reabsorption of phosphorus, and lipid phosphorus. En: *Laboratory Manual of Pediatric Microbiochemical Techniques*. 4th. Edition. Harper & Row Publishers. New York; pp. 252-256.
- Ióvine E, Selva AA. *El Laboratorio en la Clínica*. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; 1985;pp. 285-286.
- Lei KY. Dietary copper: cholesterol and lipoprotein metabolism. *Annu Rev Nutr* 1991;11: 265-283.
- Lei KY. Plasma cholesterol response in copper deficiency. En: *Role of Copper in Lipid Metabolism*. (Lei, KY & Carr, TP., eds). CRC Press. Boca Raton. Fl.; 1990;pp. 1-23.
- Lei KY. Alterations in plasma lipids, lipoproteins and apolipoprotein concentrations in copper-deficient rats. *J Nutr* 1983;113: 2178-2183.
- Toth E, Remes P. Effect of increased depletion of copper, supplementary cholesterol diet and stress on the cholesterol concentration in wall of rat thoracic aorta. *Acta Physiol Hung* 1994;82: 125-130.

30. Milne DB, Nielsen FH. Effects of a diet low in copper on copper-status indicators in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1996;63: 358-364.
31. Fields M, Lewis CG. Hepatic iron overload may contribute to hypertriglyceridemia and hipercolesterolemia in copper-deficient rats. *Metabolism* 1997;46: 377-381.
32. Mason KE. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *J Nutr* 1979;109:1979-2066.
33. Fields M, Lewis CG. Cholesterol-lowering nature of insaturated fat in rats may be due to its inability to increase hepatic iron. *Metabolismo* 1999;48: 200-204.
34. Amine EK, Desilels EJ, Hegsted DM: Effect of dietary fats on lipogenesis in iron deficiency anemic chicks and rats. *J Nutr* 106:405-411, 1976.
35. Sherman AR. Copper and iron deficiencies: Effects on serum lipids and tissue minerals. *Nutr Res* 1981;1:363-372.
36. Bowering J, Masch GA, Lewis AR. Enhancement of iron absorption in iron depleted rats by increasing dietary fat. *J Nutr* 1977;107:1687-1693.
37. Cunnane SC, McAdoo KR. Iron intake influences essential fatty acids and lipid composition of rat plasma and erythrocytes. *J Nutr* 1987;117:1514-1519.
38. Singh RB, Sharma VK, Singh R, Rastogi SS. Does increased consumption of dietary copper decrease blood lipids?. *Trace Elem Med* 1992;9: 28-33.
39. Jones AA, DiSilvestro RA, Coleman M, Wagner T. Copper supplementation of adult men: effects on blood copper enzyme activities and indicators of cardiovascular disease risk. *Metabolism* 1997;46 :1380-1383.
40. Medeiros DM, Milton A, Brunett E, Stacy L. Copper supplementation effects on indicators of copper status and serum cholesterol in adult males. *Biol Trace Elem Res* 1991;30: 19-35.
41. Anke M. Role of trace elements in the dynamics of arteriosclerosis. *Z Gesamte Inn Med* 1986;41:105-111.
42. Mills CF. Dietary interactions involving the trace elements. *Annu Rev Nutr* 1985;5: 173-193.
43. Mills CF. Trace Elements Interactions: Effects of dietary composition on the development of imbalance and toxicity. En: *Trace Element Metabolism in Animals-2*. (Hoekstra WG, Suttie JW, Ganther HE and Mertz W. Eds.). University Park Press. Baltimore. 1974;78-90.
44. Burch RE, Williams RV, Hahn HKJ, Jetton MM, Sullivan JF. Serum and tissue enzyme activity and trace-element content in response to zinc deficiency in the pig. *Clin Chem* 1975;21: 568-577.
45. Topping DR, Hillman JE, Dreosti RP, Trimble R, Record JR. Effects of zinc deficiency on bile acid secretion in the rat. *Nutr. Rep. Int.* 1978;18: 631-637.
46. Sandstead H, Klevay L, Mahalko J, Inman W, Bolonchur H, Lukaski G, Lykken T, Kramer L, Johnson D, Wallwork, J. Marginal Zn nutriture: effects on lipid metabolism and plasma zinc. *Am J Clin Nutr* 1980;33: 994 (abstr)
47. Koo SI, Williams DA. Relationship between the nutritional status of zinc and cholesterol concentration of serum lipoproteins in adult male rats. *Am J Clin Nutr* 1981;34: 2376-2381.
48. Koo SI, Lee CC. Compositional changes in plasma high-density lipoprotein particlers in marginally zinc-deficient male rats: *Am J Clin Nutr.* 1988;47:120-127.
49. Gallagher CH, Judah ID, Rees KR. The biochemistry of copper deficiency. II. Synthetic processes. *Proc Roy Soc London B Biol* 1956;145: 195-205.
50. Cunnane SC, McAdoo KR, Prohaska JR. Lipid and fatty acid composition of organs from copper-deficient mice. *J Nutr* 1986;116: 1248-1256.
51. Myres AW, Bowland JP. Fatty acids composition and distribution of ¹⁴C-glucose activity in lipid classes of porcine subcutaneous fat. *Can J Anim Sci* 1974;54: 645-650,
52. Myres AW, Bowland JP. Influence of dietary copper on the fatty acid composition of adipose tissue and on the level and composition of plasma free fatty acids in growing pigs fed individually or in groups. *Can J Anim Sci.* 1975;55: 315-324.
53. Faelli V, Giordina F. Behaviour of serum copper in the diabetic and its possible relation with free fatty acids. *Minerva Med* 1971;62: 3186-3199.
54. Cunnane SC, Horrobin DF, Manku MS. Contrasting effects of low and high copper intake on rat tissue lipid essential fatty acid composition. *Ann Nutr Metab* 1985;29:103-110.
55. Sherman AR (1981) Copper and iron deficiencies: Effects on serum lipids and tissue minerals. *Nutr Res* 1:363-372.
56. Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in Eastern Finnish men. *Circulation* 1992;86: 803-811.
57. Van Jaarsveld H; Pool GF, Barnard HC. Influence of ferritin levels on LDL cholesterol concentration in women. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997;98:201-208.

Recibido:16-10-1999

Aceptado:26-07-2000