

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POST GRADO

MAESTRÍA EN NUTRICIÓN



**“COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO, MORFOMETRÍA INTESTINAL
Y COBRE HEPÁTICO EN CUYES ALIMENTADOS CON NIVELES
FARMACOLÓGICOS DE COBRE EN LA DIETA”**

Presentado por:

LUIS ALFREDO NAKANDAKARI ARASHIRO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Lima - Perú

2013

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de niveles farmacológicos de cobre suplementario en la dieta sobre el comportamiento productivo, morfometría intestinal y cobre hepático en cuyes. Se emplearon 60 cuyes machos destetados, distribuidos en cuatro tratamientos, con cinco repeticiones por tratamiento y tres animales por repetición. Los tratamientos evaluados fueron: T1, dieta basal (0 ppm Cu suplementario); T2, dieta basal + 100 ppm Cu; T3, dieta basal + 200 ppm Cu y T4, dieta basal + 300 ppm Cu suplementario como sulfato de cobre. El periodo de evaluación fue de 56 días. Los parámetros productivos medidos fueron peso inicial, peso final, ganancia diaria de peso, consumo voluntario de alimento conversión alimenticia y mortalidad. Al final del ensayo, se sacrificaron cinco animales por tratamiento y se tomaron muestras de intestino delgado para realizar las mediciones de la altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación altura de vellosidad:profundidad de cripta. Asimismo, se tomaron muestras de tejido hepático para determinar el contenido de cobre en hígado y evaluación histológica, y para determinación de cobre en heces muestras de digesta directamente del ciego. Los resultados mostraron que ninguno de los parámetros productivos evaluados fueron afectados significativamente ($P>0.05$) por los tratamientos dietarios. Por otro lado, la suplementación de cobre no mostró efecto benéfico sobre la morfometría intestinal y por el contrario causó una reducción significativa ($P<0.05$) de la altura de vellosidad y relación de altura de vellosidad con profundidad de cripta conforme se aumentó el nivel de suplementación. El nivel de cobre hepático y en las heces aumentaron significativamente ($P<0.05$) conforme aumentaron los niveles cobre en la dieta. En conclusión, la suplementación de niveles farmacológicos de cobre en la dieta de cuyes en engorde no tuvo efecto sobre el comportamiento productivo, tuvo un efecto negativo sobre la morfometría intestinal, pero incremento la concentración de cobre tanto en el hígado como en las heces.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of dietary pharmacological levels of supplementary copper on the performance, intestinal morphometry, hepatic copper, and copper in feces of guinea pigs. Sixty weaned male guinea pigs were used for this experiment. They were randomly distributed into four treatments with five replicates each and three animals per replicate. The treatments evaluated were: T1, basal diet (0 ppm of supplementary Cu); T2, basal diet + 100 ppm Cu; T3, basal diet + 200 ppm Cu and T4, basal diet + 300 ppm Cu supplementary as copper sulfate. The evaluation period was 56 days. Initial weight, final weight, daily gain, voluntary feed intake, feed conversion ratio and mortality were measured. At the end of the experiment, five animals per treatment were sacrificed to take intestinal tissue samples to measure villus height, crypt depth and villus height: crypt depth ratio. Additionally liver samples were taken for histological evaluation and to determine its copper content, and digest cecum samples to determine copper concentration in feces. The results showed that the performance of guinea pigs were not significantly affected ($P>0.05$) by the dietary treatments. On the other hand, supplementary copper did not show a beneficial effect on intestinal morphometry and, on the contrary, it caused a significantly reduction ($P<0.05$) of the villus height and villus height: crypt depth ratio as the level of supplementary copper increased. The copper concentration in liver and feces increased significantly ($P<0.05$) as the level of supplementary copper increased. In conclusion, dietary pharmacological levels of supplementary copper showed a negative effect on intestinal morphometry and increased the concentration of copper in liver and feces, but did not have any influence on the performance of fattening guinea pigs.

L51.
N3
T
C.1

ÍNDICE

Página

	ACTA DE SUSTENTACIÓN.	
	DEDICATORIA.	
	AGRADECIMIENTOS.	
	RESUMEN.	
	SUMMARY.	
I	INTRODUCCIÓN.	1
II	REVISIÓN DE LITERATURA.	2
	2.1 El cobre.	2
	2.2 Requerimiento de cobre del cuy.	2
	2.3 Funciones del cobre.	3
	2.4 Metabolismo del cobre.	4
	2.5 Factores que afectan la absorción de cobre.	6
	2.6 Deficiencia de cobre.	8
	2.7 Toxicidad del cobre en el animal.	9
	2.8 Cobre como promotor de crecimiento.	11
III	MATERIALES Y METODOLOGÍA.	15
	3.1 Lugar de ejecución y duración.	15
	3.2 Animales Experimentales.	15
	3.3 Instalaciones y equipos.	15
	3.4 Tratamientos.	15

43/12

3.5 Régimen de alimentación.	19
3.6 Mediciones de los parámetros productivos.	19
3.7 Altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación altura de vellosidad/profundidad de cripta.	20
3.8 Nivel de cobre hepático.	21
3.9 Nivel de cobre en las heces.	22
3.10 Análisis de hemoglobina, proteína sérica y enzimas de daño hepático.	22
3.11 Evaluación histológica del tejido hepático.	23
3.12 Diseño estadístico.	23
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	25
V CONCLUSIONES.	46
VI RECOMENDACIONES.	47
VII REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.	48
VIII ANEXOS.	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 1:	Valor nutritivo calculado de dieta basal empleada en la etapa de crecimiento – engorde.	17
Cuadro 2:	Nivel de cobre en las dietas experimentales.	18
Cuadro 3:	Efecto del cobre sobre el comportamiento productivo de cuyes.	26
Cuadro 4:	Efecto del cobre sobre altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación de altura con profundidad a nivel de yeyuno medio en el cuy.	29
Cuadro 5:	Efecto del cobre sobre la concentración del cobre en el hígado.	36
Cuadro 6:	Efecto del cobre sobre la concentración de cobre en heces.	38
Cuadro 7:	Efecto del cobre en niveles farmacológicos en la dieta de cuyes sobre los niveles de hemoglobina, proteína total, albúmina, globulina, alaninoaminotransferasa (ALT) y aspartatoaminotransferasa (AST).	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1:	Imágenes histológicas al microscopio de campo claro (10x), de la mucosa del yeyunode cuyes procedente de los Tratamiento 1, 2, 3 y 4. Coloración H-E.	31
Figura 2:	Imágenes histológicas al microscopio de campo claro (10x), del tejido hepático de cuyes de los Tratamiento 1, 2, 3, y 4. Coloración. H-E.	44

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		Página
I.	Efecto del cobre sobre el peso vivo de cuyes (g) a los 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días del periodo de engorde	57
II.	Peso vivo de los cuyes (g) a los 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, y 56 días del periodo de engorde	58
III.	Efecto del cobre sobre la ganancia de peso diaria de cuyes (g) a la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del periodo de engorde.	59
IV.	Ganancia de peso diaria de los cuyes (g) a la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del periodo de engorde.	60
V.	Efecto del cobre sobre el consumo de alimento semanal de cuyes (g) a la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del periodo de engorde.	61
VI.	Consumo de alimento semanal de cuyes (g) a la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del periodo de engorde.	62
VII.	Efecto del cobre sobre la conversión alimenticia semanal de cuyes (g) a la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del periodo de engorde.	63
VIII.	Conversión alimenticia semanal de cuyes (g) a la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del periodo de engorde.	64
IX.	Concentración de cobre en el hígado (ppm).	65
X.	Concentración de cobre en heces (ppm).	66
XI.	Medidas a nivel del yeyuno medio (μm).	67
XII.	Evaluación histológica del tejido hepático.	68

I. INTRODUCCIÓN

La población nacional y mundial está en constante crecimiento y con ello la necesidad de fuentes alimenticias tanto de origen animal como vegetal y este hecho conlleva la mejora de las prácticas productivas, por ejemplo zootécnicas y agronómicas, con la finalidad de hacer uso más eficiente de los recursos existentes. Por otro lado, del total de proteína requerido por los humanos, se estima que por lo menos el 45 % debe ser de origen animal, lo que obliga a mejorar la producción de animales domésticos para satisfacer la demanda por estos productos. Dentro de esta línea, la carne de cuy es una alternativa que está siendo cada vez más importante como fuente de proteína animal. Investigaciones recientes en cuyes muestran los efectos de programas de alimentación, promotores de crecimiento, uso de aditivos nutricionales y no nutricionales, manejo, etc., con el propósito de incrementar el rendimiento productivo de esta especie.

El cobre es elemento traza esencial en diferentes reacciones metabólicas en el organismo que participa, por ejemplo, en la formación de la hemoglobina para el transporte de oxígeno en la sangre, la producción de energía en la cadena respiratoria mitocondrial, la defensa frente a los radicales libres que dañan a las membranas celulares, la formación de colágeno y elastina, entre otras funciones. Además de cumplir un rol esencial en el organismo, se ha demostrado que el cobre suplementario en la dieta a niveles farmacológicos como promotor de crecimiento tiene efectos benéficos sobre las respuestas productivas de aves, cerdos y conejos; sin embargo, existe limitada información sobre el efecto de cobre suplementario en el engorde de cuyes, la morfometría intestinal o acumulación en el hígado de estos animales.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es evaluar el comportamiento productivo, morfometría intestinal y cobre hepático en cuyes de engorde alimentados con niveles farmacológicos de cobre.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cobre

La esencialidad del cobre como mineral traza para el crecimiento y la formación de hemoglobina en ratas fueron demostrados por Hart *et al* en 1928. Posteriormente, se obtuvieron evidencias experimentales indicando el rol esencial del cobre sobre el crecimiento y la prevención de una amplia gama de alteraciones clínicas y patológicas en animales de granja (Adu y Egbunike, 2010).

Muller y Klomp (2008) mencionan que el cobre es un mineral traza esencial en cualquier forma de vida, resaltando que la deficiencia o exceso de este mineral en una célula procariota o eucariota conlleva a una serie de anormalidades en su función e incluso la muerte. Estos autores citan dos enfermedades de carácter congénito en humanos y son conocidas como la enfermedad de Menkes y la enfermedad de Wilson, en las cuales el metabolismo celular del cobre se ve afectado causando la muerte si es que no se trata oportunamente. La absorción, utilización, almacenamiento y excreción de este mineral a nivel celular esta regulado por una serie de proteínas que se han conservado a lo largo de la cadena evolutiva.

2.1 Requerimiento de cobre del cuy

Las investigaciones realizadas para determinar los requerimientos de minerales en mamíferos se han realizado siguiendo el método de la curva de dosis - respuesta (European Commission, 2003). El Consejo Nacional de Investigaciones de los Estados Unidos (NRC, 1995) reporta que un nivel de 6 ppm de cobre en la dieta es requerido para un crecimiento y desarrollo normal en cuyes de laboratorio. Sin embargo, Chauca (1997) menciona que no hay reportes científicos sobre los requerimientos de cobre para cuyes de carne criados en forma comercial, por lo que los niveles actuales de cobre se basan en requerimientos establecidos para cuyes de laboratorio.

2.3 Funciones del cobre

El cobre es un mineral traza esencial importante para la activación de múltiples enzimas en el organismo como la ceruloplasmina o también llamada ferroxidasa, citocromo c oxidasa, Cu-Zn superóxido dismutasa, tirosinasa, lisil oxidasa, dopamina- β -hidroxilasa, entre otras (Lee *et al.*, 2002). Estas enzimas están involucradas en diferentes procesos vitales en el organismo, cumpliendo de esta manera diversas funciones relacionadas con la formación de la hemoglobina, generación de energía, antioxidante celular, coloración de la piel, pelo y ojos, formación de colágeno y elastina, así como en la formación de hormonas y neuropéptidos a nivel del sistema nervioso central (Robert y Sarkar, 2008).

Chung *et al.* (2004) mencionan que la importancia del cobre en el metabolismo del hierro se debe a su función como cofactor de la enzima ceruloplasmina, enzima encargada de la oxidación del hierro ferroso a férrico para su incorporación a la transferrina y posterior formación de la proteína hemoglobina, proteína encargada del transporte de oxígeno en el organismo. Así mismo, Mercer y Llanos (2003) sostienen que el cobre es importante en la generación de energía a nivel celular debido a su función como cofactor de la enzima citocromo c oxidasa, enzima importante en la cadena respiratoria de electrones a nivel mitocondrial.

Shim y Harris (2003) señalan que el cobre ayuda en la defensa celular contra las especies de oxígeno reactivo (ROS) al formar parte de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD), enzima que representa el 1% del total de la proteína celular y es la encargada de la dismutación del radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el espacio intracelular. Los autores también mencionan que este elemento traza esencial forma parte de la enzima tirosinasa, enzima encargada de la formación del pigmento melanina, importante en la coloración de la piel, ojos y pelo.

El cobre también es importante para mantener una buena función de los vasos sanguíneos. Así Smith *et al.* (2002) indican que el cobre al ser un cofactor de la enzima lisil oxidasa ayuda en la formación de las fibras de colágeno y elastina, ambas fibras de tejido

conectivo son importantes para darle forma y elasticidad a los vasos sanguíneos.

Por otro lado, Schuschke (1997) menciona que el cobre es necesario para la formación de la enzima dopamina- β -hidroxilasa a nivel del sistema nervioso central, enzima encargada de convertir la dopamina en norepinefrina, siendo la norepinefrina una hormona importante en la regulación de la presión y circulación sanguínea gracias a su efecto estimulante del sistema cardiovascular aumentando el ritmo cardíaco y estimulando la vasoconstricción de los vasos sanguíneos.

2.4 Metabolismo del cobre

Estudios realizados con la ayuda de radioisótopos marcados han demostrado que la absorción de cobre ocurre a nivel del estómago e intestino delgado, siendo mayor la absorción a nivel intestinal e insignificante a nivel estomacal (Lönnerdal, 1996). A nivel intestinal, la mayor absorción tiene lugar en el duodeno y la porción anterior del yeyuno, y está influenciado por la cantidad de este mineral en la dieta, maximizándose la absorción cuando la concentración de este elemento en la dieta es baja y minimizándose cuando la concentración es alta (Mercer y Llanos, 2003).

La fuente de cobre en la dieta también influye en su absorción siendo las fuentes inorgánicas en forma de sales como acetato, carbonato, cloruro o sulfato las que presentan una buena disponibilidad para ser absorbidos a nivel intestinal; sin embargo, la disponibilidad del óxido de cobre es menor en comparación con las fuentes antes mencionadas (Wapnir, 1998). Independientemente de la fuente inorgánica, el cobre en la dieta está como Cu^{+2} , el cual debe ser reducido a Cu^{+} por la acción de las enzimas metaloreductasas ubicadas en el borde de cepillo de las vellosidades intestinales (Lönnerdal, 2008). El cobre ingerido que no es absorbido, se elimina en las heces y la concentración en algunos casos puede representar hasta un 85% del cobre ingerido (Robert y Sarkar, 2008).

Una vez que el Cu^{+2} es reducido a Cu^{+} éste se une a la proteína transportadora de cobre

(CTR 1) para su absorción a nivel del duodeno y parte proximal del yeyuno. La CTR 1 es una proteína integral de la membrana citoplasmática del enterocito, la cual posee tres sitios de unión para el Cu^+ , siendo la principal proteína involucrada en la absorción de este mineral a nivel intestinal. La CTR 1 también se encuentra presente a nivel de las células del hígado, riñón, cerebro, entre otros órganos (Prohaska, 2008). Por otro lado, Roberts y Sarkar (2008) sugieren que el cobre también puede ser absorbido, pero en menor grado, por medio de la proteína transportadora de cationes divalentes (DMT1), importante en la absorción de hierro.

Cuando el cobre logra ingresar al enterocito con ayuda de la CTR 1, éste se une a la proteína transportadora ATP 7A, importante para el transporte e ingreso del cobre a la red de trans Golgi donde tiene lugar la formación de las metaloenzimas dependientes de cobre, como las enzimas Cu-Zn superóxido dismutasa, citocromo c oxidasa, entre otras. La proteína transportadora ATP 7A también participa en el paso de este mineral por la membrana baso lateral del enterocito, con lo cual se da el ingreso del cobre a la circulación portal (Vonk *et al*, 2008). El ingreso del cobre al enterocito por medio de la CTR 1 no requiere de energía ni de una gradiente de protones, pero la salida de este mineral por medio de la proteína transportadora ATP 7A si es dependiente de energía; además, la proteína transportadora ATP 7A sólo se encuentra a nivel del enterocito (Prohaska, 2008).

Cuando el cobre logra ingresar a la circulación portal se une principalmente a la albumina plasmática y en menor grado a aminoácidos libres, siendo el más importante el aminoácido histidina, para ser transportado con dirección al hígado (Roberts y Sarkar, 2008). En el hígado, el cobre ingresa al hepatocito con la ayuda de la CTR 1, una vez ingresado, este mineral no puede estar libre como Cu^+ , debido a su alta capacidad para formar radicales libres, por esta razón es rápidamente unida a metalochaperones en el interior del hepatocito, los cuales transportaran al cobre para la formación de las metaloenzimas que poseen a este mineral en su estructura (Prohaska, 2008).

Los metalochaperones encargados del transporte intracelular del cobre son los siguientes:

- a) Superóxido dismutasa 1 (CCS1), el cual transporta al cobre para su incorporación a la

enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD), enzima importante como defensa antioxidante a nivel intracelular.

- b) COX 17, la cual transporta al cobre para que este forme parte de la enzima citocromo c oxidasa en la cadena respiratoria mitocondrial, esta enzima es importante en el proceso de generación de energía a nivel mitocondrial.
- c) ATOX 1 guía a este mineral en dirección a la proteína transportadora ATP 7B, cuya función es ayudar a la excreción del cobre hepático, favoreciendo la formación de la holoceruloplasmina, proteína que contiene seis moléculas de cobre y es importante para el transporte de este mineral en la circulación sanguínea. Así mismo, cuando se satura la vía de excreción por medio de la holoceruloplasmina, la ATP 7B ayuda a la excreción de cobre por medio del sistema biliar, excretándose por las heces (Mercer y Llanos, 2003).

Robert y Sarkar (2008) mencionan que la biodisponibilidad del cobre excretado por medio del sistema biliar es nula al encontrarse formando complejos que no tienen la capacidad de ser reabsorbido a nivel intestinal, eliminándose por medio de las heces.

2.5 Factores que afectan la absorción de cobre

Además de la cantidad y la fuente cobre, la absorción del cobre a nivel intestinal se ve influenciada por la presencia de diferentes factores en la dieta. Así un estudio realizado en mujeres no gestantes, empleando isótopos estables (^{65}Cu), ha demostrado que la fuente de proteína en la dieta afecta la absorción de cobre, siendo mayor la absorción en dietas a base de proteína animal en comparación con la dieta a base de proteína vegetal (Lönnerdal, 1996). Sin embargo, Greger y Mulvaney (1985), realizaron un estudio en ratas alimentadas con una dieta a base de lactoalbúmina y cinco diferentes fuentes de proteína de soya, encontrando una mayor retención de cobre en las dietas a base de proteína de soya en comparación con la dieta en base a lactoalbúmina, esta diferencia se debió a la presencia de altos niveles de zinc en la dieta a base de lactoalbúmina, lo cual afectó negativamente la absorción de cobre.

La absorción de cobre se ve afectado negativamente por la presencia de zinc en la dieta, esto se demostró en un estudio realizado en monos Rhesus infantiles, encontrándose una disminución en la absorción de cobre a causa de un aumento en la absorción de zinc debido a una deficiencia marginal de este elemento traza, demostrando así la interacción del zinc en la absorción de cobre (Lönnnerdal, 1996). La interacción del zinc sobre la absorción del cobre es explicado por Hill y Matrone (1970) quienes mencionan que dichos minerales comparten la misma configuración electrónica interactuando mutuamente a nivel de la proteína transportadora de cobre (CTR 1) durante el proceso de absorción, los autores demostraron que niveles elevados de zinc en la dieta afecta la absorción de cobre. Además del zinc, el hierro también interfiere con la absorción de cobre cuando este mineral se presenta en niveles marginales o deficientes en la dieta (Johnson y Murphy, 1988).

La presencia de fitato en la dieta afecta negativamente la absorción de diversos minerales como el calcio, fósforo, zinc entre otros. Dada la similitud en la configuración electrónica entre el cobre y el zinc es que Turnlund *et al.* (1985) estudiaron con la ayuda de isótopos estables el efecto del fitato en la absorción del cobre en hombres jóvenes, encontrando que a diferencia del zinc, la absorción del cobre no se vio afectado negativamente, esto se debió a una precipitación del completo zinc-fitato por efecto del pH del tracto gastrointestinal, lo cual formo un complejo que limitó la absorción de zinc, a diferencia con el complejo de cobre-fitato el cual no se vio afectado por el pH del tracto gastrointestinal y además se presentó un reemplazo del fitato unido al cobre por un aminoácido, formando un complejo cobre-aminoácido favoreciendo la absorción de dicho mineral.

Lönnnerdal (1996), menciona que algunos aminoácidos forman complejos con cationes divalentes como el cobre, por ejemplo el aminoácido histidina que puede unirse fácilmente al cobre, siendo la afinidad por este mineral tres veces mayor en comparación con su afinidad por el zinc, es por esta razón que el aminoácido histidina se une al cobre para su transporte en la circulación portal. Sin embargo Robbins y Baker (1980) reportan en aves que hay otros aminoácidos en la dieta que afectan negativamente la absorción del cobre, demostrado que el aminoácido cisteína disminuye la absorción del cobre porque favorece la absorción de zinc. Los autores antes mencionado señalan que los complejos formados entre cobre y aminoácidos

como lisina o metionina, no han mostrado un efecto significativo en la absorción de este mineral, pero es una alternativa al efecto negativo de la cisteína y ácido ascórbico en la absorción del cobre, porque en este caso el cobre se absorbe unido a los aminoácidos lisina o metionina evitando la interacción con el zinc por el mismo transportador.

El ácido ascórbico, es también un antagonista del cobre en roedores, aves, lagomórfos, cuyes, primates y humanos. Un consumo de 1500 mg por día de ácido ascórbico durante 64 días en adultos jóvenes conllevó a un descenso de los niveles de ceruloplasmina, el cual volvió a sus niveles normales luego de 20 días después de interrumpir la suplementación con ácido ascórbico (Johnson y Murphy, 1988). Hamilton y Bidlack (1980) estudiaron en cuyes la interacción del ácido ascórbico en la absorción del cobre, encontrando una reducción del cobre sérico y hepático en un 59 y 32% respectivamente a un nivel de suplementación de 225 mg por día de ácido ascórbico, durante 21 días.

2.6 Deficiencia de cobre

Everson *et al.* (1967) estudiaron los efectos de la deficiencia de cobre en el cuy, encontrado anemia (hemoglobina entre 7.5 a 8 g/dl), además de pelaje hirsuto y despigmentado en el grupo de cuyes hembras jóvenes alimentadas con 0.5 a 0.7 ppm de cobre en dietas semipurificadas, sin embargo los autores no encontraron efecto significativamente negativo sobre el crecimiento en comparación con los cuyes alimentados con la dieta control (6 ppm de cobre). Así mismo, la deficiencia de cobre no tuvo efecto negativo sobre el tamaño ni peso de camada al nacimiento en comparación con el grupo control.

También se ha estudiado el efecto de la deficiencia de cobre en otras especies, es así como Chung *et al.* (2004) reportan que la deficiencia de cobre en ratas causa alteraciones en el metabolismo del hierro, causando una anemia de tipo microcítica (baja hemoglobina) y microcromática. Johnson y Murphy (1988) mencionan que la deficiencia de cobre está relacionada con la presencia de anemia, la cual se agrava con la suplementación con hierro debido a la interferencia entre ambos minerales durante el proceso de absorción. Por otro lado,

también se ha mencionado que el cobre es un mineral importante en la generación de energía a nivel mitocondrial al ser un cofactor de la enzima citocromo c oxidasa, el cual cumple un rol vital como generador energético en el cerebro (Mercer y Llanos, 2003). Gybina y Prohaska (2003) mencionan que a la evaluación del cerebro por medio de microscopía electrónica en ratones deficientes de cobre se aprecia un alargamiento de las mitocondrias, el cual se dio como un mecanismo de compensación frente a la reducción en la producción de energía, el cual puede llegar a reducirse hasta en un 80% a causa de una deficiencia en la función de la enzima citocromo c oxidasa en la cadena respiratoria mitocondrial, reduciéndose de esta manera la producción de ATP a nivel cerebral, iniciando así el proceso de apoptosis o muerte celular programada.

La deficiencia de cobre también tiene un efecto negativo sobre la función de la enzima lisil oxidasa, afectando negativamente la producción de colágeno y elastina en todo el organismo (Klevay, 2000). Es así como en un estudio realizado por Smith *et al.* (2002) se menciona que una deficiencia en la función de la enzima lisil oxidasa causa problemas en la formación de la matriz del tejido óseo, el cual se debe a una falta de colágeno, produciendo malformaciones óseas debido a una pobre capacidad de mineralización, sobre todo a nivel del fémur y vertebras en las ratas alimentadas con dietas deficitarias en cobre.

2.7 Toxicidad del cobre en el animal

En una revisión realizada por Prohaska (2008) el autor menciona que el cobre y el hierro son dos elementos trazas esenciales para la vida; sin embargo, estos dos minerales tienen una fuerte habilidad para formar radicales libres cuando se encuentran libres en solución, es por esta razón que ambos minerales se encuentran en el organismo unidos a proteínas, reduciéndose de esta manera el efecto tóxico de estos dos minerales. El cobre en exceso se comporta como un agente prooxidante al catalizar la formación de moléculas reactivas de hidroxi-radicales por medio de la reacción de Haber-Weiss, provocando un daño a nivel de los lípidos de la membrana celular así como de las organelas celulares y al ácido desoxiribunucleico (ADN) de las células del tejido hepático, renal, cardíaco, cerebral e

intestinal (Turnlund *et al.*, 2004).

Según Turnlund *et al.* (2004) el organismo controla la absorción de cobre a nivel intestinal por medio de la expresión de la proteína transportadora de cobre (CTR 1), como un mecanismo de defensa contra la ingesta excesiva de este mineral traza, el cual tiene un efecto tóxico si es que no se controla su absorción. Así mismo, Vonk *et al.* (2008) resaltan la importancia de la proteína ATP 7A como regulador del paso del cobre por el enterocito en dirección a la circulación portal.

Por otro lado, el hígado es el principal órgano de almacenamiento de cobre en el organismo, es por ello que se toma a este órgano como referencia para determinar el estatus de este mineral cuando se sospecha de deficiencia o toxicidad (European Committion, 2003). En los estados de toxicidad hepática se produce una disfunción de este órgano metabólico así como cambios histológicos en su arquitectura celular (Navarro y Senior, 2006). Es por ello de la importancia de las pruebas de laboratorio para determinar la funcionalidad de este órgano metabólico, por ejemplo, las enzimas Alanino Aminotransferasa (ALT) y Aspartato Aminotransferasa (AST), ambas enzimas se localizan principalmente en la membrana celular de los hepatocitos, pero también se pueden encontrar, en menor grado, en otros órganos como riñón, corazón, músculo esquelético, cerebro y glóbulos rojos. Estas dos enzimas son liberadas a la circulación sanguínea cuando se presenta un daño a nivel de los hepatocitos, existiendo una correlación positiva entre los niveles de ambas enzimas y el grado de daño del tejido hepático (Desmond, 2002).

El hígado también es un órgano metabólico importante en la síntesis de proteínas como la albúmina, hemoglobina, globulinas, entre otras. La producción de estas proteínas se ve afectada cuando hay algún proceso que afecte el normal funcionamiento de este órgano, es por ello la importancia de cuantificar el nivel de las proteínas séricas en el organismo (Desmond, 2002).

No obstante las mediciones de los niveles de las enzimas como ALT y AST así como el de las proteínas séricas sólo son un indicativo de la funcionalidad hepática, cabe resaltar que el hígado no se afecta en su función si es que no se ha afectado más del 50% de su arquitectura

celular, es por ello que la evaluación histológica del tejido hepático es de suma importancia, al indicar los cambios en el patrón celular y hemodinámico a nivel del parénquima hepático, así como el grado y localización de la degeneración o muerte celular. Es por ello que con los datos obtenidos a la evaluación histopatológica, los niveles de ALT, AST y proteínas séricas, se puede tener un mejor conocimiento del verdadero estatus morfológico y funcional del hígado (Navarro y Senior, 2006).

Los niveles tóxicos del cobre no son similares entre las diferentes especies productoras de proteína de origen animal, en el reporte realizado por la European Committion (2003), se menciona que las intoxicaciones por exceso de cobre van a depender con la especie que se este tratando, por ejemplo, los rumiantes menores como los ovinos son más susceptibles a las intoxicaciones por cobre; no obstante, los caprinos y rumiantes mayores como los vacunos presentan una tolerancia intermedia y los monogástricos como las aves y cerdos son más tolerantes a niveles elevados de cobre en la dieta, siendo la acumulación de 1000 ppm de cobre a nivel hepático incompatible con la vida para las aves y cerdos.

2.8 Cobre como promotor de crecimiento

El efecto de niveles farmacológicos de cobre como promotor de crecimiento se ha estudiado principalmente en cerdos y aves (European Committion, 2003). Pérez *et al.* (2011) reportan que 250 a 315 ppm de cobre tiene un efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento en lechones destetados. Zea (2011) menciona que 250 ppm de cobre en la dieta de pollos de carne, tuvo un efecto significativo sobre la conversión alimenticia. Adu y egbunike (2010) concluyen que 300 ppm de cobre en la dieta de conejos tuvo efecto positivo como promotor de crecimiento. Espíritu (1990) estudió el efecto del cobre como promotor de crecimiento en cuyes, encontrando que la suplementación de cobre entre 200 a 300 ppm tuvo efecto significativo sobre los pesos finales.

Originalmente se propuso que la acción de niveles farmacológicos de cobre en la dieta es semejante al de los antibióticos promotores de crecimiento por su acción sobre la microflora intestinal (Apgar *et al.*, 1995). En una revisión realizada por Hodgkinson y Petris (2012) los

autores mencionan que el cobre se ha empleado desde siglos atrás como un agente antimicrobial en los procesos de desinfección del agua, así como en el campo de la medicina. El efecto antimicrobial del cobre se basa en la habilidad de este mineral en la generación de especies de oxígeno reactivo, moléculas que son tóxicas para células de tipo procariotas y eucariotas al causar daño directo sobre los lípidos y proteínas de membranas celulares e incluso el material genético.

Estudios realizados in-vitro dieron como resultado que 250 ppm de cobre redujo la cuenta de colonias de *E. Coli* procedentes de contenido intestinal incubadas por 24 horas a 37 °C (Pang *et al*, 2009). Un estudio realizado por Arias y Koutsos (2006), en pollos de carne, demostraron el efecto benéfico del cobre sobre la microflora y fisiología intestinal, al reducir la susceptibilidad de las aves a padecer de enfermedades gastrointestinales así como a una mejor absorción de nutrientes a consecuencia de una reducción en el número de linfocitos recluidos a nivel de la lamina propia en la mucosa intestinal, lo cual demostró el efecto positivo de la suplementación de niveles farmacológicos de cobre sobre la salud intestinal.

La flora gastrointestinal interactúa directa o indirectamente con la capa de mucus, la cual es producida y secretada por las células caliciformes de las vellosidades intestinales, esta capa de mucus recubre las células que conforman las vellosidades intestinales cumpliendo un rol importante como barrera física al evitar que las bacterias y tóxicos se adhieran a ella. Un desbalance en la flora gastrointestinal aumenta la susceptibilidad a infecciones gastrointestinales por una alteración en la capa de mucus, por ejemplo algunas bacterias producen una enzima llamada ureasa, enzima encargada de convertir la urea en amoníaco la cual afecta la producción y características físico-químicas del mucus (Hedemann *et al*, 2006).

Así mismo, las bacterias y sus metabolitos como el amoníaco, reducen el metabolismo y la tasa de vida de los enterocitos, siendo perjudicial para la salud intestinal, afectando la tasa de recambio celular lo cual produce una reducción de la altura de vellosidad y aumento en la profundidad de cripta a nivel de la mucosa intestinal, así como reduciendo la actividad y cantidad de las enzimas digestivas secretadas por las células del borde de cepillo de las vellosidades intestinales, afectando de esta manera la tasa de digestión y absorción de nutrientes por parte del animal, (Radecki *et al*, 1992). Recientemente en un estudio realizado

por Zhao *et al.* (2007) encontraron que el cobre en la dieta a niveles farmacológicos, tuvo un efecto significativo al aumentar la altura de la vellosidad intestinal, reducir la profundidad de cripta y por ende la relación altura de vellosidad con profundidad de cripta, lográndose un aumento en el área de absorción de nutrientes, así como una disminución del gasto energético a nivel intestinal, lo que se traduce en una disminución del requerimiento de energía para mantenimiento, destinando mayor energía y nutrientes para ganancia de peso.

Shurson *et al.* (1990) así como Fry *et al.* (2012), concuerdan que a mayor altura de vellosidad mayor será el área de absorción de nutrientes, así como la importancia de evaluar la profundidad de cripta a nivel de las vellosidades intestinales. La profundidad de cripta es un parámetro importante que indica la tasa de recambio celular a nivel de la mucosa intestinal, presentándose una correlación positiva entre el número de células y la profundidad de cripta. A mayor profundidad de cripta mayor síntesis celular a causa de una mayor tasa de recambio celular, aumentando la demanda de energía destinada para funciones de mantenimiento.

Además del efecto del cobre sobre la flora bacterial así como en la salud intestinal, también se ha propuesto el efecto sistémico del cobre como estimulador del apetito y regulador del crecimiento. Así, Zhou *et al.* (1994a) pusieron en evidencia la acción del cobre como estimulante del apetito al favorecer la secreción del neuropéptido Y (NPY). El NPY es un potente neurotransmisor estimulador del apetito, el cual es sintetizado a nivel del cuerpo del núcleo arcuato y liberado por los núcleos paraventriculares a nivel del hipotálamo en el sistema nervioso central. Estudios realizados en ratas han demostrado que la infusión del NPY a nivel de los núcleos paraventriculares muestran un aumento en el consumo de carbohidratos, si la infusión es continua se produce una hiperfagia que conlleva a un estado de obesidad (Lee *et al.*, 1998).

En otro estudio Zhou *et al.* (1994b) sugirieron la acción del cobre a nivel sistémico sobre la velocidad de crecimiento. Para ello, administraron histidinato de cobre vía endovenoso a cerdos destetados, encontrando un aumento de la concentración del ARNm de la hormona de crecimiento, frente a este hallazgo los autores concluyeron que el cobre tiene un efecto sobre la regulación del crecimiento al estimular la producción de la hormona de crecimiento. Un

estudio realizado por Campbell *et al.* (1989) administraron hormona de crecimiento exógena a cerdos entre 30 a 60 kg de peso vivo, reportaron un aumento de peso estadísticamente significativo con respecto al control, el cual se debió a un aumento en la tasa de deposición proteica gracias a un efecto estimulante de la hormona de crecimiento exógena. Los autores sostienen que la hormona de crecimiento trabaja estimulando la producción de las somatomedinas, las cuales promueven la proliferación y diferenciación de las células satélites para que estas se conviertan en tejido muscular.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución y duración

La fase experimental del presente estudio se realizó en la granja de investigación en cuyes, ubicada en el Programa de Investigación en Carnes de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), durante los meses de Abril a Junio del 2012 y tuvo una duración de 56 días.

3.2 Animales Experimentales

Se emplearon 60 cuyes machos destetados (14 a 18 días de edad) procedentes de una granja comercial ubicada en la provincia de Cañete - Perú, los cuales fueron distribuidos en 4 tratamientos con 5 repeticiones cada uno y 3 animales por poza o repetición.

3.3 Instalaciones y equipos

Se construyeron 20 pozas con un área de 0.1 m^2 por cuy, construidas artesanalmente a base de ladrillo en piso de concreto. Cada poza estaba implementada con un comedero y bebedero, ambos de arcilla enlosados.

3.4 Tratamientos

La fuente de cobre suplementario en los tratamientos fue el sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) con un nivel de 25.2% de Cu.

Los tratamientos a evaluar fueron los siguientes:

- Tratamiento 1: Dieta Basal.
- Tratamiento 2: Dieta Basal + 100 ppm de Cu.
- Tratamiento 3: Dieta Basal + 200 ppm de Cu.
- Tratamiento 4: Dieta Basal + 300 ppm de Cu.

La dieta basal fue el alimento integral comercial “*La Molina*” para cuyes, de la Planta de Alimentos del Programa de Investigación en Alimentos de la Facultad de Zootecnia de la UNALM, cuyo valor nutricional calculado se presenta en el Cuadro 1.

La presentación de la dieta basal fue en base a harina, teniendo como ingredientes los siguientes insumos: maíz amarillo, torta de soya 48, pasta de algodón, torta de girasol, subproductos de trigo, heno de alfalfa, carbonato de calcio, fosfato dicálcico, aminoácidos sintéticos, vitaminas, minerales y sal.

Para la preparación de las dietas experimentales de los Tratamientos 2, 3 y 4 se realizó el cálculo de la cantidad requerida para suplementar 100, 200 y 300 ppm de cobre en la dieta. Posteriormente, se procedió a realizar el mezclado para lo cual se utilizó una mezcladora con capacidad para 5 kg de alimento y tuvo una duración de 5 min.

Una vez finalizada la preparación de las dietas experimentales, se tomó una muestra de 200 g de dieta por tratamiento para determinar el contenido total de cobre en la dieta por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica siguiendo la metodología de la Norma Oficial Mexicana (NOM-117-SSA1-1994), el cual se realizó en el Laboratorio de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF) de la Facultad de Agronomía de la UNALM.

El contenido actual de cobre en las dietas experimentales se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 1: Valor nutritivo calculado de dieta basal empleada en la etapa de crecimiento - engorde.

Valor Nutricional (Calculado)	Dieta Basal
Energía Digestible, Mcal/Kg, Mín	2.80
Proteína Bruta, %, Mín	18.00
Fibra Cruda, %, Mín	8.00
Calcio, %, Máx	0.80
Fósforo Total, % Mín	0.80
Sodio, %, Mín	0.20
Lisina, %, Mín	0.84
Metionoa - Cistina, %, Mín	0.60
Arginina, %, Mín	1.20
Treonina, %, Mín	0.60
Triptófano, %, Mín	0.18
Ac. Ascórbico, mg/100	20.00
Cobre, ppm	10.00

Cuadro 2: Nivel de cobre en las dietas experimentales

Medición	Nivel de cobre suplementario (ppm)			
	0	100	200	300
Cobre (ppm)	22	124	230	325

3.5 Régimen de alimentación.

Se proporcionó alimento fresco *ad libitum*, en comederos limpios una vez al día (9 am) durante 56 días, tiempo que duró el experimento. Se registraron diariamente la cantidad de alimento ofrecido y alimento sobrante del día anterior. También se proporcionó agua limpia y fresca *ad libitum* todos los días con exclusión de forraje.

3.6 Mediciones de los parámetros productivos

Peso Vivo y Ganancia de Peso

Se registraron el peso vivo inicial, semanal y final de los cuyes, para ello se empleó una balanza electrónica con capacidad máxima de 15 kg. Posteriormente se determinó la ganancia diaria de peso (GDP), la ganancia semanal de peso (GSP), así como la ganancia total de peso (GTP). Finalmente, se realizaron los siguientes cálculos:

- Ganancia total de peso (g): $\text{Peso vivo final (día 56)} - \text{Peso vivo inicial (día 1)}$.
- Ganancia semanal de peso (g): $\text{Peso vivo al final de cada semana} - \text{Peso vivo al inicio de la semana correspondiente}$.
- Ganancia diaria de peso (g): $\text{Ganancia total de peso} / 56 \text{ días}$

Consumo de alimento

Se registraron el consumo diario, semanal y total de alimento, para ello se empleó una balanza electrónica con capacidad máxima de 15 kg. Posteriormente se determinó el consumo diario de alimento (CDA), consumo semanal de alimento (CSA) así como el consumo total de alimento (CTA). Finalmente, se realizaron los siguientes cálculos:

- Consumo diario de alimento (g): Alimento ofrecido diario – Alimento no consumido diario.
- Consumo semanal de alimento (g): Alimento ofrecido en la semana – Alimento no consumido en la semana.
- Consumo total de alimento (g): Total de alimento suministrado – Total de alimento no consumido.

Conversión alimenticia

Obtenido los valores de ganancia diaria de peso y consumo de diario alimento se pasó a determinar la conversión diaria de alimento (C.D.A).

- Conversión diaria de alimento = Consumo diario de alimento / Ganancia diaria de Peso.

3.7 Altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación altura de vellosidad/ profundidad de cripta

Después del beneficio de los animales se identificó y retiró el intestino delgado. Luego se aisló el segmento intestinal correspondiente al yeyuno, posteriormente se identificó el punto medio del yeyuno tomado como referencia la parte inicial y final del yeyuno, para lo cual se tomaron como referencia los siguientes puntos anatómicos:

- Yeyuno parte inicial: unión duodeno – yeyuno, a nivel de la desembocadura del conducto biliar.
- Yeyuno parte final: unión yeyuno – íleon, a nivel del divertículo de Meckel

Se tomó una muestra de dos cm de largo a nivel del punto medio del yeyuno, luego la muestra se almacenó en un frasco con formol al 40% y fue transportado al Laboratorio de Histología y Patología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana

Cayetano Heredia (FAVEZ – UPCH) para su posterior procesamiento, el cual consistió en la tinción de la muestra con Hematoxilina – Eosina (H – E) y la preparación de las láminas histológicas para la determinación de la Altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación altura de vellosidad con profundidad de cripta, para ello se empleó un microscopio de campo claro y se tomó el promedio de 10 vellosidades a un aumento de 10x. Donde se realizaron las siguientes mediciones:

- Altura de vellosidad: distancia entre el ápice con la base de la vellosidad expresado en μm
- Profundidad de cripta: distancia entre la base de la vellosidad con la base de la cripta μm .
- La relación de altura de vellosidad con profundidad de cripta: cociente entre la altura de vellosidad con la profundidad de cripta.

Para la evaluación de la morfometría intestinal a nivel del yeyuno medio, se siguieron los métodos indicados por Bernal (2011).

3.8 Nivel de cobre hepático

El hígado libre de vesícula biliar fue envasado, rotulado y almacenado en una bolsa plástica. Luego fue colocado en una placa Petri para ser secado a 60°C por 72 horas en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) del Departamento Académico de Nutrición de la Facultad de Zootecnia de la UNALM. Terminado el proceso de secado, molido y envasado, la muestra fue enviada al LASPAF de la Facultad de Agronomía de la UNALM para la determinación del contenido de cobre hepático, el cual fue determinado por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica siguiendo la metodología de la Norma Oficial Mexicana (NOM-117-SSA1-1994).

3.9 Nivel de cobre en las heces

Las heces fueron extraídas directamente del ciego. Luego fueron almacenadas en una bolsa plástica y transportadas al LENA del Departamento Académico de Nutrición de la Facultad de Zootecnia de la UNALM. En el LENA las muestras se colocaron en un pocillo de metal e introducidas a la estufa para que sean secadas a 60° C por 72 horas. Finalizado el proceso de secado, molido y envasado las muestras fueron enviadas al LASPAF de la Facultad de Agronomía de la UNALM, para la posterior determinación de cobre en las heces por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica siguiendo la metodología de la Norma Oficial Mexicana (NOM-117-SSA1-1994).

3.10 Análisis de hemoglobina, proteína séricas y enzimas de daño hepático

Durante el desangrado en el proceso de beneficio, se recolectó sangre en un tubo vacutainer, conteniendo Ácido Etilendiaminetetracético (EDTA) como anticoagulante para determinar el nivel de hemoglobina en sangre, el cual se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica de la FAVEZ – UPCH. El nivel de hemoglobina se determinó por medio de un espectrofotómetro de haz de luz siguiendo el método indicado por Gjurinovic (2008).

Por otro lado se recolectó sangre en un tubo vacutainer sin anticoagulante para determinar los niveles de proteína total, albumina y globulinas en sangre, así como los niveles de las enzimas relacionadas a daño hepático como la enzima Alanino-aminotransferasa (ALT) y Aspartato-aminotransferasa (AST). Las determinaciones antes mencionadas se realizaron en el Laboratorio de Patología Clínica de la FAVEZ – UPCH, para ello se empleó un espectrofotómetro de haz de luz y se realizaron siguiendo los métodos indicados Gjurinovic (2008).

3.11 Evaluación histológica del tejido hepático

Se extrajeron dos cm² de muestra del tejido hepático. Luego la muestra fue envasada, rotulada y transportada al Laboratorio de Histología y Patología de la FAVEZ – UPCH. En el laboratorio se procedió a la tinción y preparación de las láminas histológicas. Finalmente con la ayuda de un microscopio de campo claro, se procedió a evaluar los cambios histológicos a nivel de la arquitectura del tejido hepático, para ello se emplearon aumentos de 4, 10 y 40x. Según los cambios observados en el patrón celular del parénquima hepático a la evaluación histológica, se asignaron grados entre 0 a 4 para determinar el grado de lesión a causa del efecto del cobre sobre la arquitectura del tejido hepático. A continuación se describen los diferentes grados con sus respectivas lesiones a nivel de la arquitectura del tejido hepático descritas por Bernal (2011):

Grado 0: no presencia de daño tisular

Grado 1: presencia de degeneración tisular más congestión sanguínea

Grado 2: presencia de necrosis focal

Grado 3: presencia de necrosis multifocal

3.12 Diseño estadístico

Se empleó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento. Para el análisis de varianza (ANOVA), se utilizó el paquete estadístico *Statistical Analysis System (SAS, 1999)*

El modelo aditivo lineal fue el siguiente:

$$Y_{ij} = u + t_i + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Valor o rendimiento en la i – ésima unidad experimental a la que se le aplicó el j – ésimo tratamiento.

μ : Media poblacional.

t_i : Efecto del i – ésimo tratamiento.

e_{ij} : Error Experimental.

La comparación de medias se realizó utilizando la Prueba de Duncan (Duncan, 1955), con un nivel de $\alpha = 0.05$.

Los datos obtenidos en la evaluación histológica del tejido hepático son de características no paramétricas; por lo tanto, se realizó el análisis de regresión logística utilizando el programa R-Project for Statical Computing 2.6.1 (R Development Core Team, 2006).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del cobre sobre el comportamiento productivo en cuyes

El Cuadro 3 muestra el efecto del cobre a niveles farmacológicos (0, 100, 200 y 300 ppm) en la dieta, sobre el comportamiento productivo en cuyes durante un periodo de engorde de 56 días. Los pesos vivos al inicio y final del experimento, la ganancia diaria de peso, el consumo diario de alimento así como la conversión alimenticia, no fueron significativamente ($P>0.05$) por efecto de los tratamientos dietarios.

Los resultados del comportamiento productivo de los cuyes del presente estudio difieren de los resultados obtenidos por Espíritu (1990), cuyo experimento fue realizado en cuyes con una duración de 84 días y con suplementaciones de 0, 100, 200, 300 y 400 ppm de cobre en una dieta mixta forraje – concentrado, encontrando efecto positivo significativo a la suplementación del cobre sobre la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia con respecto a la dieta no suplementada, a diferencia del presente estudio donde no se encontró efecto significativo alguno sobre los parámetros productivos antes mencionados. El autor concluye, que una suplementación de 200 ppm de cobre se obtiene mejor resultado, logrando un peso final de 1 200 g, una ganancia de peso de 10 g/día, un consumo de alimento en base a materia seca (MS) de 107 g/día y una conversión alimenticia de 10. La diferencia entre los resultados de ambos estudio se puede deber a las condiciones ambientales y estatus sanitarios donde se realizaron los experimentos.

A diferencia del estudio realizado por Espíritu (1990), el comportamiento del efecto del cobre sobre los parámetros productivo en los cuyes del presente estudio, guarda relación con los resultados obtenidos por Hedemann *et al.* (2006) en lechones, quienes evaluaron el efecto de la suplementación de 175 ppm de cobre en la dieta de lechones destetados por un periodo de 14 días, los autores no encontraron efecto positivo del cobre sobre la ganancia de peso y consumo de alimento en comparación con el grupo control no suplementado.

Cuadro 3: Efecto del cobre sobre el comportamiento productivo de cuyes.

Medición	Nivel de cobre suplementario (ppm)			
	0	100	200	300
Peso inicial, g	289.0 ^{1a}	268.0 ^a	307.0 ^a	296.0 ^a
Peso final, g	903.0 ^a	868.0 ^a	911.0 ^a	920.0 ^a
Ganancia de peso, g/día	10.9 ^a	10.7 ^a	10.8 ^a	11.2 ^a
Consumo de alimento, g/día	48.5 ^a	51.6 ^a	54.5 ^a	55.3 ^a
Conversión alimenticia	4.42 ^a	4.82 ^a	5.07 ^a	4.96 ^a

¹. Valores promedio, de cinco repeticiones de tres animales por repetición.

^a. Valores con letras similares son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

La misma tendencia fue reportada por Almeida *et al.* (2003) quienes en un estudio realizado en pollos de carne encontraron que la suplementación de cobre como citrato (75 ppm) ó sulfato (200 ppm) no tuvo efecto benéfico sobre la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia en un periodo de 42 días. En los dos estudios antes mencionados, los autores sostienen que los resultados obtenidos se deben al buen estado sanitario de las instalaciones donde se realizaron los experimentos y a la buena salud de los animales durante el periodo experimental (Almeida *et al.*, 2003; Hedemann *et al.*, 2006).

El presente estudio se realizó en la granja de investigación en cuyes de la facultad de Zootecnia de la UNALM, en donde se mantuvo un buen estatus sanitario antes y durante el experimento. Se realizó una previa desinfección del galpón antes de la introducción de los animales y se utilizó cama nueva. Así mismo los animales estuvieron clínicamente sanos durante todo el experimento. Almeida *et al.* (2003), mencionan que se deben realizar varios experimentos en el mismo ambiente para que se pueda apreciar un efecto positivo del cobre sobre los parámetros productivos en los animales suplementados, confirmando los resultados obtenidos por Johnson *et al.* (1985) quienes evaluaron el efecto de la suplementación de 125 ppm de cobre en la dieta de pollos de carne sobre el comportamiento productivo en 4 experimentos realizados de forma sucesiva durante un periodo de un año, cabe resaltar que no se removió la cama entre los 4 experimentos. Los autores no encontraron diferencia significativa sobre la ganancia de peso y conversión alimenticia entre los pollos suplementados y no suplementados en los dos primeros experimentos. Sin embargo, al tercer y cuarto experimento se encontró un efecto positivo sobre la ganancia de peso y conversión alimenticia en los pollos suplementados en comparación a los no suplementados.

Arias y Koustos (2006), compararon los efectos de una combinación de antibióticos promotores de crecimiento (APC), con los efectos del cobre como sulfato o cloruro tribásico a un nivel de 188 ppm y un grupo control sin suplementación, sobre el peso vivo al beneficio y peso de la canal en pollos de carne criados en dos tipos de cama: cama sucia (cama reutilizada) y cama limpia (cama nueva). Los autores encontraron mayor peso vivo al beneficio y canales más pesadas en los pollos suplementados con APC ó cobre, en comparación con el grupo control criados en la cama sucia. Este resultados se debe a una

mayor concentración de bacterias y otros microorganismos en las camas reutilizadas en comparación con la cama nueva, incrementando la exposición y la probabilidad de infección de tipo gastrointestinal en las aves, es por ello que al suplementar con APC ó cobre en la dieta se obtiene un efecto benéfico al reducir y controlar la carga bacteriana a nivel del tracto gastrointestinal, reduciendo la incidencia de las afecciones gastrointestinales y maximizando el crecimiento. Sin embargo, se encontró un efecto negativo de los APC sobre el peso en los pollos al beneficio y peso de la canal en las aves criadas en la cama limpia, en comparación a los pollos del grupo control y los pollos suplementados con cobre. Los autores concuerdan que el efecto negativo de los APC en los pollos criados en cama limpia, se debió a un efecto negativo de los APC sobre la microflora benéfica del tracto gastrointestinal, los cuales ayudan a la digestión y absorción de los alimentos por parte del ave.

4.2 Efecto del cobre sobre la morfometría intestinal

En el Cuadro 4 se observa el efecto de la suplementación de 0, 100, 200, y 300 ppm de cobre en la dieta de cuyes sobre la morfometría intestinal a nivel del yeyuno medio, encontrándose diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Animales que recibieron el Tratamiento 1 mostraron la mayor altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación de altura de vellosidad con profundidad de cripta en comparación con los de animales que recibieron los otros tres tratamientos. Los valores de los parámetros antes mencionados decrecen conforme aumenta el nivel de suplementación de cobre.

Al producirse una reducción en la altura de vellosidad, se afecta la capacidad de producción y secreción de las enzimas digestivas (carbohidrasas, lipasas y proteasas), y también una disminución en la capacidad de absorción de nutrientes por parte de las células del borde de cepillo, ubicadas en el extremo apical de las vellosidades intestinales, afectando de esta manera la digestión y absorción de nutrientes (Hedemann *et al*, 2006).

Cuadro 4: Efecto del cobre sobre altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación de altura con profundidad a nivel de yeyuno medio en el cuy.

Medición	Nivel de cobre suplementario (ppm)			
	0	100	200	300
Altura de vellosidad (um)	999.4 ^{1a}	835.2 ^b	606.2 ^c	422.6 ^d
Profundidad de cripta (um)	235.4 ^a	214.0 ^b	168.2 ^c	172.6 ^c
Relación de altura con profundidad	4.25 ^a	3.90 ^b	3.61 ^c	2.46 ^d

¹. Valores promedio, de cinco repeticiones de 10 observaciones por repetición

^{abcd}. Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes (P<0.05).

Al producirse una reducción en la altura de vellosidad, se afecta la capacidad de producción y secreción de las enzimas digestivas (carbohidrasas, lipasas y proteasas), y también una disminución en la capacidad de absorción de nutrientes por parte de las células del borde de cepillo, ubicadas en el extremo apical de las vellosidades intestinales, afectando de esta manera la digestión y absorción de nutrientes (Hedemann *et al*, 2006).

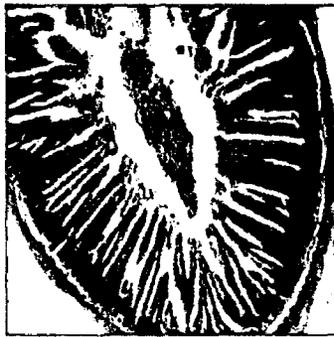
Por otro lado, en las imágenes histológicas presentadas en las Figura 1, se observan las diferencias entre altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación altura de vellosidad con profundidad de cripta entre los Tratamientos 1, 2, 3 y 4. Estas imágenes histológicas, demuestran el efecto negativo del cobre sobre los parámetros morfométricos antes mencionados. Conforme aumentan los niveles de suplementación de este elemento, se produce una reducción en los parámetros morfométricos a nivel de mucosa intestinal del yeyuno medio.

La tendencia de los resultados del efecto de la suplementación de cobre, sobre la morfometría intestinal a nivel del yeyuno en el presente estudio, no posee el mismo patrón de comportamiento que los resultados reportado por Zhao *et al.* (2007) quienes encontraron un efecto benéfico del cobre (proteinato de cobre) a un nivel de 200 ppm en lechones destetados, al incrementar la altura de vellosidad y por ende la relación altura de vellosidad con profundidad de cripta, a nivel del yeyuno en comparación con los lechones no suplementados. Tampoco guarda relación con los resultados reportados por Zea (2011), quien menciona que la suplementación de 250 ppm de cobre en la dieta de pollos de carne, tuvo un efecto positivo sobre la morfometría intestinal, al incrementar la altura y área de vellosidad a nivel del yeyuno.

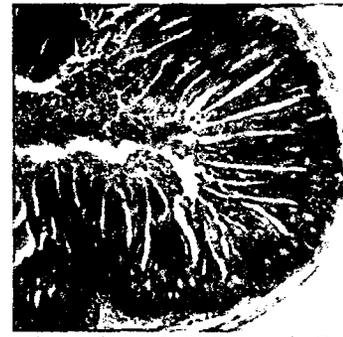
Figura 1: Imágenes histológicas al microscopio de campo claro (10x) de la mucosa del yeyuno de cuyes procedente de los Tratamiento 1, 2, 3 y 4. Coloración H-E.



Tratamiento 1: 0 ppm de Cu suplementado



Tratamiento 2: 100ppm de Cu suplementado



Tratamiento 3: 200 ppm de Cu suplementado



Tratamiento 4: 300 ppm de Cu suplementado

Los resultados de los dos estudios antes mencionados en comparación con el presente estudio, se puede deber al estatus sanitario en las que se desarrollaron los experimentos. El presente estudio al mantener un buen estatus sanitario y un buen manejo del medio ambiente, conllevó a la ausencia de cuadros de diarrea y a la presencia de alimento no digerido en las heces.

Así mismo, Zhao *et al.* (2007) sostienen que el efecto del cobre en niveles farmacológicos como promotor de crecimiento es semejante al efecto de los APC, al reducir o controlar la flora bacteriana del tracto gastrointestinal. Los autores resaltan que cuando se presenta un desbalance en la flora microbial del tracto intestinal se produce un efecto negativo sobre la morfología y fisiología de la mucosa intestinal a causa de un daño directo o indirecto (toxinas ó metabolitos) sobre las células que conforman las vellosidades intestinales, produciendo de esta manera la muerte de estas células, conllevando a una reducción del tamaño de las vellosidades intestinales, afectando los procesos de digestión y absorción de nutrientes, afectando de esta manera la tasa de deposición proteica del animal.

Sin embargo, el comportamiento del efecto del cobre a niveles farmacológicos sobre la mucosa del yeyuno del presente estudio es similar al reportado por Shurson *et al.* (1990), quienes estudiaron el efecto del cobre (283 ppm) sobre la altura vellosidad, ancho de vellosidad y profundidad de cripta, en lechones libres de gérmenes patógenos (SPF) y lechones comerciales, con el objetivo de investigar el efecto de niveles farmacológicos de cobre en lechones SPF, quienes al no tener una microflora en el tracto gastrointestinal, presentan una mejor morfometría intestinal en comparación con los lechones comerciales. Para ello, los lechones SPF fueron criados en un área controlada libre de patógenos y los lechones comerciales fueron criados en un área convencional. Tanto los lechones SPF como los lechones comerciales, fueron alimentados con dietas esterilizadas, las cuales fueron autoclavadas a 121°C por 25 min, y con dos niveles de suplementación de cobre (0 ppm) y 283 (ppm). Se encontró una disminución en la altura de vellosidad y profundidad de cripta a nivel del yeyuno en los lechones SPF del grupo suplementado en comparación con los lechones SPF del grupo sin suplementar y con los lechones comerciales de los grupos con o sin suplementación de cobre. Los autores concluyen, que la dieta suplementada con 283 ppm de

cobre, produce una reducción en la altura de vellosidad y profundidad de cripta en los lechones SPF, pero incrementa ambos parámetros en lechones comerciales.

Recientemente un estudio realizado por Fry *et al.* (2012) reportan resultados que también concuerda con los del presente experimento, al encontrar una disminución en la altura de vellosidad a nivel del duodeno y yeyuno proximal a una suplementación de 225 ppm de cobre en la dieta de cerdos destetados con respecto al control sin suplementación. Al igual que en las investigaciones realizadas por Shurson *et al.* (1990) y Fry *et al.* (2012) el presente estudio también reporta un efecto negativo del cobre sobre la altura de vellosidad a nivel de yeyuno, confirmando que el cobre a mejor estatus sanitario tiene un efecto negativo sobre la altura de vellosidad.

Sobre el efecto negativo del cobre a nivel de la mucosa intestinal, Fry *et al.* (2012) mencionan que el cobre puede actuar como agente prooxidante y pocos experimentos se han realizado para estudiar el efecto de niveles farmacológico de este mineral sobre la oxidación de los lípidos y el estrés oxidativo sobre las membranas celulares, es por ello que en el estudio realizado por estos autores midieron la concentración de malondialdehído (MDA), el cual es un ácido graso de tres o más dobles enlaces que se produce a consecuencia de la oxidación de los lípidos por un efecto de los radicales libres, es por ello que el MDA es un indicador que se emplea en las ciencias biológicas para la determinación del grado de oxidación de los lípidos a causa de un agente oxidante, como por ejemplo los radicales libres. Los autores encontraron, que a un nivel de 225 ppm de cobre se dio una mayor producción de MDA a nivel del duodeno y yeyuno proximal, de esta manera se demuestra el efecto tóxico del cobre sobre las células que conforman las vellosidades intestinales a causa de un estrés oxidativo, el cual daña directamente a la membrana celular causando la muerte de los enterocitos y por ende una reducción a nivel de la altura de vellosidad.

El mecanismo de la toxicidad de cobre sobre los organismos vivos ha sido descrito por Hodgkinson y Petris (2012), quienes señalan que el cobre al ser un metal en transición, tiene la capacidad de aceptar y donar electrones, esto hace que en presencia de oxígeno, este mineral pueda formar radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$) por medio de la reacción de Haber y Weiss, causando daño a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El daño a los lípidos de las membranas celulares por efecto de los radicales hidroxilos se da en cuatro fases: primero, el radical hidroxilo extrae un átomo de hidrógeno a un ácido graso que forma parte de la membrana celular (generalmente un ácido graso poliinsaturado), dando origen a un radical lípido (fase de iniciación), luego este radical lípido reacciona con el oxígeno y forma un radical peróxido (fase de propagación), a continuación estos radicales peróxidos empiezan a degradarse y van a dar como resultado la producción de un ácido graso de tres o más dobles enlaces, denominado malondialdehído (MDA) (fase de degradación), al final todos los radicales peróxidos se degradan a MDA, con lo cual se termina la reacción en cadena que afecta a los lípidos que conforman las membranas celulares (fase de terminación).

El estudio realizado por Fry *et al.* (2012) confirma los resultados obtenidos por Chiou *et al.* (1999) quienes evaluaron el efecto del cobre a razón de 250 ppm y 500 ppm en la dieta sobre la morfología intestinal en pollos de carne. Los autores reportan una reducción significativa en la altura de vellosidad a nivel del duodeno en los pollos alimentados con dietas suplementadas con 250 ppm de cobre, en comparación con las aves no suplementadas. Pero cuando se suplemento 500 ppm de cobre en la dieta, se produjo una severa reducción en la altura de vellosidad a nivel del duodeno y yeyuno en comparación con los pollos suplementados con 250 ppm de cobre ó no suplementados, afectando de esta manera las funciones de la mucosa intestinal como son la de protección o barrera contra el paso de patógenos y toxina del tracto gastrointestinal al organismo, así como la digestión y absorción de nutrientes, a causa de un aumento en la tasa de recambio celular. Los autores mencionan que la tasa de recambio celular en los pollos de carne es de aproximadamente 48 a 96 horas, lo cual conlleva a que las células maduras perduren por más tiempo en el borde de cepillo a nivel del ápice de la vellosidad intestinal, estas células maduras son las responsable de la producción y secreción de las enzimas digestivas favoreciendo de esta forma los procesos de digestión y absorción de nutrientes, el cual se ve afectado cuando se produce un aumento en la

tasa de recambio celular, conllevando a que células inmaduras, las cuales no tienen las mismas funciones que una célula madura, sean las que se localicen en el borde de cepillo, afectando negativamente los procesos de digestión y absorción de nutrientes.

4.3 Efecto del cobre sobre la concentración de cobre en el hígado

En el Cuadro 5 se presenta la concentración de cobre en el hígado. La retención de este esencial mineral a nivel hepático se eleva gradualmente conforme aumentan los nivel farmacológicos de cobre en la dieta, encontrándose diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

El comportamiento de la retención de cobre a nivel hepático del presente estudio es similar al que se ha obtenido en cerdos (Fry *et al*, 2012), pollos de carne (Luo *et al*, 2005), y conejos (Adu y Egbunike, 2010). En dichas especies también se encontraron un aumento significativo del cobre retenido a nivel hepático conforme se aumentó la suplementación de este mineral en la dieta.

Utilizando al cerdo como modelo experimental, Bowland *et al*. (1961) demostraron con el uso del cobre marcado (^{64}Cu), que este elemento traza esencial se almacena principalmente en el hígado y que la distribución de este mineral a nivel hepático es estadísticamente similar entre los cuatro lóbulos que la conforman. Por otro lado, En la revisión realizada por Robert y Sarkar (2008) así como en la de Vonk *et al*. (2008) los autores de ambas revisiones, concuerdan que el hígado es principal órgano en el metabolismo del cobre. En este órgano el cobre no puede estar libre, porque al ser un metal de transición este tiende fácilmente a formar radicales libres en contacto con el oxígeno, es por ello que ni bien ingresa el cobre al hepatocito, este mineral esencial debe ser unido rápidamente a las proteínas transportadoras de cobre, a los chaperones de cobre ó almacenado como parte de la metalotioneína (MT), el cual es una proteína rica en el aminoácido cisteína, importante en el almacenamiento de minerales trazas como el cobre y que se encuentran dentro del aparato de Golgi en los hepatocitos

Cuadro 5: Efecto del cobre sobre la concentración de cobre en el hígado

Medición	Nivel de cobre suplementario (ppm)			
	0	100	200	300
Cobre (ppm)	72.5 ^{1d}	100.0 ^c	118.9 ^b	234.4 ^a

¹. Valores promedio, de cinco repeticiones, un animal por repetición.

^{abcd}. Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Recientemente, Fry *et al.* (2012) estudiaron el efecto del cobre sobre la expresión genética de las proteínas que se encargan de la regulación de este mineral a nivel hepático en lechones alimentados con dietas suplementadas con 225 ppm de cobre. Los investigadores no encontraron diferencia estadísticamente significativa en la expresión del ARNm de la proteína transportadora de cobre (CTR 1) a nivel hepático en los animales suplementados en comparación con los animales no suplementados, lo cual demuestra que el nivel de cobre absorbido a nivel intestinal no tiene un efecto sobre la expresión de la CTR 1, el cual es una proteína importante para el ingreso del cobre al hígado, a diferencia de la CTR 1 a nivel intestinal el cual si es regulado por la presencia de cobre en la dieta. Sin embargo los autores encontraron diferencia estadística significativa en la expresión del ARNm de la metalotioneína (MT), el cual se eleva de forma significativa en los animales suplementados en comparación con el control sin suplementar, demostrando de esta manera, que el cobre se almacena a nivel hepático unido a la MT y que la concentración de esta proteína a nivel hepático es regulado por la presencia de cobre en este órgano.

4.4 Efecto del cobre sobre la concentración de cobre en heces

El nivel de cobre excretado en las heces se presenta en el Cuadro 6. La concentración de cobre en las heces aumentan conforme aumentan los nivel farmacológicos de cobre en la dieta, encontrándose diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$).

El comportamiento del cobre excretado en las heces en el presente estudio tiene la misma tendencia a los obtenidos por Castell *et al.* (1975) y Adu y Egbunike (2010) quienes trabajaron con cerdos y conejos respectivamente, encontrando un aumento significativo de cobre en las heces conforme se aumenta el nivel de suplementación de este mineral en la dieta.

Cuadro 6: Efecto del cobre sobre la concentración de cobre en heces

Medición	Nivel de cobre suplementario (ppm)			
	0	100	200	300
Cobre (ppm)	90.2 ^{1d}	254.1 ^c	419.0 ^b	638.0 ^a

¹. Valores promedio, de cinco repeticiones, un muestra por repetición.

^{abcd}. Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Bowland *et al.* (1961) estudiaron el proceso de absorción, distribución y excreción de cobre isotópicamente marcado en cerdos a los que se les suministró diferentes niveles de cobre vía oral o intravenoso, los autores reportaron que cuando se le suministró cobre a una nivel de 24 ppm en la dieta, el nivel de absorción fue de un 8.7%, pero cuando se le suministro un nivel de 185 ppm de cobre en la dieta, el nivel de absorción se redujo a un 2.9%, lo cual representa una reducción de la tercera parte de la absorción cuando se le suministra cobre a razón de 24 ppm. El estudio realizado por Bowland *et al.* (1961) demuestra que la absorción de cobre es menor al 10%, cuando este mineral es suplementado a niveles farmacológico en la dieta de cerdos. Así mismo el estudio reporta que cuando el cobre es administrado vía oral, este demora en alcanzar su máximo nivel de excreción por las heces entre 17 a 20 horas post-ingestión.

Los investigadores concluyen que las heces son la principal ruta de excreción del cobre y que el cobre endógeno es eliminado por el sistema biliar representando un 40% del total del cobre excretado en las heces. Fry *et al.* (2012) sostienen que el cobre excretado por medio del sistema biliar es pobremente absorbido, debido a que se encuentra formando complejos, los cuales no permiten la reabsorción de este mineral a nivel intestinal. Armstrong *et al.* (2000) concluyeron que cerdos alimentados con dietas suplementadas con 225 ppm de cobre, presentan una mayor excreción de cobre por medio del sistema biliar, que los animales no suplementados, por otro lado, Armstrong *et al.* (2004) mencionan que la suplementación de cobre en niveles farmacológicos en la dieta, conlleva a una eliminación por las heces de un aproximadamente del 90% del cobre ingerido.

4.5 Efecto del cobre sobre la hemoglobina, proteína sérica y enzimas de daño hepático

En el Cuadro 7 se muestra los valores de hemoglobina (g/dl), valores de proteína sérica como proteína total (g/dl), albúmina (g/dl) y globulina (g/dl) así como también los valores de las enzimas que demuestran daño hepático como la alanina aminotransferasa (ALT) (U/L) y aspartato aminotransferasa (AST) (U/L), los cuales se encuentran dentro de los valores normales que reporta el International Species Information System (ISIS) (2002) para cuyes de laboratorio.

El comportamiento del resultado del efecto del cobre sobre los niveles de hemoglobina del presente estudio es similar al reportado Castell y Bowland (1968) quienes no encontraron diferencia estadística significativa en el nivel de hemoglobina en lechones suplementados con niveles de 286 ppm de cobre en la dieta con respecto a los animales no suplementados. Así como el reportado por Adu y Ebugnike (2011) quienes evaluaron el efecto de la suplementación de 0, 100, 200, y 300 ppm de cobre en la dieta de conejos sobre el nivel de hemoglobina, encontrando similares resultados entre los grupos suplementados con el control sin suplementar.

Los resultados de los niveles de proteína total, albúmina y globulina del presente estudio, difieren de los resultados presentados por Chiou *et al.* (1999) quienes reportaron que una suplementación de 500 ppm de cobre en la dieta, no tuvo efecto alguno sobre los valores de proteína total en pollos de carne, concluyendo que un nivel de 500 ppm de cobre no tuvo efecto negativo sobre el metabolismo de las proteínas, a pesar de reportarse un daño hepático al encontrar valores elevados de las enzimas ALT y AST. A diferencia de los resultados reportado por Chiou *et al.* (1999), en los resultados del presente estudio se encontró diferencia estadística significativa de la suplementación de cobre sobre los niveles de proteína total, albúmina y globulina, pero los niveles de las enzimas ALT y AST fueron estadísticamente similares y dentro del rango establecido para la especie (ISIS, 2002).

Cuadro 7. Efecto del cobre en niveles farmacológicos en la dieta de cuyes sobre lo niveles de hemoglobina, proteína total, albúmina, globulina, alaninoaminotransferasa (ALT) y aspartatoaminotransferasa (AST).

Medición	Nivel de cobre suplementario (ppm)			
	0	100	200	300
Hemoglobina ²	13.6 ^{1a}	13.7 ^a	13.7 ^a	13.5 ^a
Proteína total ³	3.8 ^b	4.1 ^a	3.9 ^{ab}	4.1 ^{ab}
Albúmina ⁴	2.9 ^{ab}	3.0 ^a	2.7 ^b	2.7 ^b
Globulina ⁵	0.9 ^b	1.1 ^b	1.2 ^a	1.4 ^a
ALT ⁶	66.2 ^a	66 ^a	64.8 ^a	66.4 ^a
AST ⁷	179.4 ^a	181 ^a	182.8 ^a	184.2 ^a

¹. Valores promedio, de cinco repeticiones, una muestra por repetición

^{2,3,4,5}. Valores expresados en g/dl.

⁶. ALT: Alanina aminotransferasa; valores expresados en U/L

⁷. AST: Aspartato aminotransferasa; valores expresados en U/L

^{ab}. Valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferente (P<0.05).

El comportamiento del efecto del cobre sobre los valores de las enzimas ALT y AST del presente estudio son diferentes a los resultados reportado por Rahman *et al.* (2001) quienes investigaron el efecto de la suplementación de cobre (350 ppm) sobre los valores hematológicos y la composición de la carne en pollos broiler, encontrando diferencia estadística significativa en los niveles de las enzimas ALT y AST entre el grupo de pollos broiler con suplementación de cobre en comparación con el grupo no suplementado. Los autores mencionan que una suplementación por encima de 300 ppm de cobre en la dieta de pollos de carne, produce una elevación de las enzimas que demuestran daño hepático como la ALT y AST, lo cual concuerda con lo reportado por Chen *et al.* (1996) y Chiou *et al.* (1999) quienes también sostienen que una suplementación en niveles farmacológicos de cobre en la dieta de pollos de carne causa un aumento de las enzimas ALT y AST, debido a un daño hepático a causa de los efectos tóxicos del cobre sobre este órgano. Pratt y Kaplan (2000) mencionan que las enzimas aminotransferasas como la ALT y AST son dos enzimas que se encuentran formando parte de la membrana celular de las células hepáticas y que son liberadas a la circulación sanguínea cuando hay un daño al hepatocito, resaltando que no es necesario la muerte del hepatocito para su liberación. Es por ello que ambas enzimas son dos indicadores de daño hepático muy sensibles, que se liberan cuando existe algún daño a las células de este órgano, incluso en los primeros estadios para evaluar los efectos de una sustancia tóxica sobre el tejido hepático.

4.6 Efecto del cobre sobre la evaluación histológica del tejido hepático

La evaluación histológica del tejido hepático por medio de un microscopio de campo claro, no reportó daño tisular en el parénquima hepático entre los tratamientos 1 y 2, a diferencia de los tratamientos 3 y 4 en los cuales se encontró un daño hepático de grado 1, debido a la presencia de una leve degeneración tisular acompañada de congestión sanguínea. El análisis estadístico de los datos (grado de lesión), que comprendió un análisis de regresión logística por ser medidas de carácter no paramétrica, resultó en la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de lesión} = - 5.71 + 0.02467 X$$

El intercepto y el coeficiente de regresión tienen valores diferentes de cero ($P < 0.05$) lo que indica que la suplementación de niveles farmacológicos de cobre evaluados en este estudio incrementa el daño al parénquima hepático en una proporción de 0.02467 por cada cambio en la cantidad de cobre suplementario.

El cobre cuando ingresar al organismo se almacena principalmente en el hígado, siendo este el principal órgano en el metabolismo de este mineral traza. Una mayor retención de cobre hepático produce una disminución de la enzima glutatión peroxidasa, enzima importante del sistema antioxidante celular, debido al efecto oxidante de la acumulación de cobre a nivel hepático, causando un daño degenerativo a las células del parénquima de este órgano metabólico (Fry *et al*, 2012).

En la Figura 2 se muestran las imágenes histológicas del efecto de la suplementación de cobre (0, 100, 200 y 300 ppm) sobre la arquitectura celular del parénquima hepático. Como se puede apreciar en las imágenes de los tratamientos 1 y 2 el detalle morfológico y el componente celular del tejido hepático aun persiste. A diferencia de la imagen de los tratamientos 3 y 4, en donde se aprecia algunas células aumentadas de tamaño, las cuales se encuentran en un estado de degeneración grasa, sumado a ello también se aprecia un ligero grado de congestión sanguínea a nivel de la vena centrolobillar y la triada portal.

A la evaluación de las imágenes histológicas, se aprecia que el cobre tuvo un efecto tóxico leve sobre el parénquima hepático a una suplementación de 200 y 300 ppm en la dieta, a pesar que los niveles de las enzimas AST y ALT estuvieron en un rango clínicamente normal.

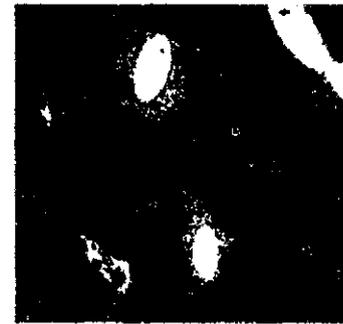
Figura 2: Imágenes histológicas al microscopio de campo claro (10x), del tejido hepático de cuyes de los Tratamiento 1, 2, 3, y 4.
Coloración. H-E.



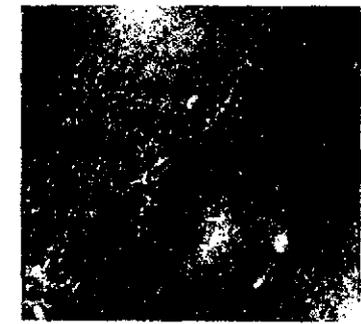
Tratamiento 1: 0 ppm de Cu
suplementado



Tratamiento 2: 100 ppm de Cu
suplementado



Tratamiento 3: 200 ppm de Cu
suplementado



Tratamiento 4: 300 ppm de Cu
suplementado

La tendencia de los resultados del presente estudio, no son similares a los resultados obtenidos por Iqbal *et al.* (2012) quienes estudiaron el efecto de 100, 500, 1000 y 2000 ppm de cobre en la dieta de pollos de carne, encontrando una leve degeneración y necrosis celular en el parénquima hepático a un nivel de suplementación de 100 ppm de cobre en la dieta, pero a un nivel de suplementación de 500 ppm se encontró hemorragias y leve degeneración a nivel del tejido hepático. No obstante, los autores reportaron un efecto tóxico severo sobre el tejido hepático a una suplementación de 1000 a 2000 ppm de cobre, reportándose cambios severos en la arquitectura celular y hemodinámicos, como necrosis con infiltración mononuclear, así como hemorragias y engrosamiento de las paredes de los vasos sanguíneos.

Así mismo, Păunescu *et al.* (2010) realizaron un estudio para evaluar el efecto tóxico de un fungicida llamado Champion 50WP, el cual contiene cobre como principio activo, sobre la estructura hepática de la rana Marshal (*Rana ridibunda*). A la evaluación de las imágenes histológicas del tejido hepático, los investigadores encontraron una necrosis masiva y fibrosis del parénquima hepático. Los investigadores mencionan que el hígado es el principal órgano encargado de mantener la homeostasis de este mineral en el organismo, es por ello que un exceso de cobre en la dieta hace que este mineral se almacene unido a las metalotioneinas (MT) dentro de los hepatocitos. Pero un almacenamiento elevado de este mineral en los hepatocitos, como lo que sucede cuando se suplementa grandes cantidades de cobre en la dieta, tiene un efecto tóxico sobre el hepatocito, aumentando los niveles de las enzimas que indican daño hepático a nivel sanguíneo y junto a las imágenes histológicas, se puede determinar el grado de toxicidad de este mineral sobre el parénquima hepático.

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se ha realizado el presente estudio, se concluye que:

1. El cobre en la dieta a niveles farmacológicos no mostró influencia significativa sobre el comportamiento productivo de los cuyes.
2. La suplementación de cobre en la dieta no tuvo efecto benéfico sobre la morfometría intestinal.
3. La suplementación de cobre a niveles farmacológicos en la dieta resultó en una mayor retención ($P < 0.05$) de cobre a nivel hepático.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

1. Realizar investigaciones sobre el efecto de fuentes alternativas de cobre en los parámetros productivos así como su impacto sobre la salud intestinal en cuyes criados en un ambiente comercial.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADU, O. y EGBUNIKE, G. 2010. Enhancing growing rabbits performance with diets supplemented with cooper. *Advan. Biol. Res.*, 4(1):18-22
- ALMEIDA, M., MACHADO, J., MARTINEZ, M. y DAROZ, S. 2003. Cupric citrate as growth promoter for broiler chickens in different rearins stages. *Scientia Agricola*. 60:441-445.
- ARMSTRONG, T., WILLIAMS, C., SPEARS, J. y SCHIFFMAN, S. 2000. High dietary copper improves odor characteristics of swine waste. *J. Anim. Sci.* 78:859-864.
- ARMSTRONG, T., COOK, D., WARD, M., WILLIAMS, C. y SPEARS, J. 2004. Effect of dietary copper source (cupic citrate and cupric sulfate) and concentration on growth performance and fecal copper excretion in weanling pigs. *J Anim Sci.* 82:1234-1240.
- APGAR, G.A.; KORNEGAY, E.T.; LINDEMANN, M.D. y NOTTER, D.R. 1995. Evaluation of copper sulfate and a copper lysine complex as growth promoters for weanling swine. *J Anim Sci.*73:2640-2646.
- ARIAS, V.J. y KOUTSOS, E.A. 2006. Effect of copper source and level on intestinal physiology and growth of broiler chickens. *Poult Scie.*85:999-1007.
- BERNAL, S. 2011. Evaluación del aceite esencial de oregano (*Origanum vulgare*) y jengibre deshidratado (*Zingiber officinale*) como alternative al uso de antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. Tesis Bach. Medicina veterinaria y zootecnia. Lima. Perú. UPCH. 40pp.
- BOWLAND, J., BRAUDE, R., CHAMBERLAIN, A., GLASCOCK, R. y MITCHELL,

- K. 1961. The absorption, distribution and excretion of labelled copper in young pigs given different quantities, as sulphate or sulphide, orally or intravenously. *Brit. J. Nutr.* 15:59-72.
- CAMPBELL, R., STEELE, N., CAPERNA, T., McMUTRY, J., SOLOMON, M. y MITCHELL, A. 1989. Effects of exogenous porcine growth hormone administration between 30 and 60 kilograms on the subsequent and overall performance of pigs grown to 90 kilograms. *J. Anim. Sci.* 67:1265-1271.
 - CASTELL, A., ALLEN, R., BEAMES, R., BELL, J., BELZILE, R., BOWLAND, J., ELLIQT, J., IHNAT, M., LARMOND, E., MALLARD, T., SPURR, D., STOTHERS, S., WILTON, S. y YOUNG, L. 1975. Copper Supplementation of Canadian Diets for Growing – Finishing Pigs. *J Anim Sci.* 55:113-134.
 - CASTELL, A. y BOWLAND, J. 1968. Supplemental copper for swine: effects upon hemoglobin, serum protein and tissue copper levels. *Can. J. Anim Sci.* 48:415-424.
 - CHAUCA, L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). La Molina: INIA. 78p.
 - CHEN, K., WU, C. y LU, J. 1996. Effects of dietary copper levels on performance, tissues and serochemistry value of Taiwan country chicken. *J. Biomass Energy Soc. Chin.* 15:70-5.
 - CHIOU, P., CHEN, C., CHEN, K. y WU, C. 1999. Effect of high dietary copper on the morphology of gastro-intestinal tract in broiler chickens. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 4:548-553.
 - CHUNG, J., PROHASKA, J. y WESSLING-RESNICK, M. 2004. Ferroportin-1 is not upregulated in copper-deficient mice. *J. Nutr.* 134:517-521.
 - DESMOND, M. 2002. Liver function: test selection and interpretation of results. *Clin*

Lab Med 22:337-390.

- DUNCAN, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*. 11:1-42.
- ESPÍRITU, G. 1990. Uso del sulfato de cobre como promotor de crecimiento en cuyes destetados. Tesis Zootecnia. Huancayo. Perú. UNCP. 47pp
- EUROPEAN COMMISSION. 2003. Opinion of the scientific committee for animal nutrition on the use of copper in feedingstuffs. [Internet].[Acceso 15 abril 2011]. Disponible es: http://www.ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out115_en.pdf
- EVERSON, G., CHOW TSAI, H. y TONG IN, W. 1967. Copper deficiency in the guinea pig. 93:533-540.
- FRY, R., ASHWELL, M., LLOYD, K., O'NAN, T., FLOWERS, W., STEWART, K. y SPEARS, J. 2012. Amount and source of dietary copper affects small intestine morphology, duodenal lipid peroxidation, hepatic oxidative stress, and mRNA expression of hepatic copper regulatory proteins in weanling pigs. *J Anim Sci*. 90:3112-3119.
- GJURINOVIC, J. 2008. Evaluación clínica de un protocolo de anestesia equilibrada con ketamina, xilacina, tramadol y atropina en alpacas sometidas a cirugía abdominal a nivel del mar. Tesis Bach. Medicina veterinaria y zootecnia. Lima. Perú. UPCH. 23pp.
- GREGER, J. y MULVANEY, J. 1985. Absorption and tissue distribution of zinc, iron and copper by rats fed diets containing lactalbumin, soy and supplemental sulfur-containing amino acids- *J Nutr*. 115:200-10.
- GYBINA, A. y PROHASLA, J. 2003. Increased rat brain cytochrome c correlates with degree of copper deficiency rather than apoptosis. *J Nutr*. 133:33613368.
- HAMILTON, C. y BIDLACK, W. 1980. Interrelationship of dietary ascorbic acid and

iron on the tissue distribution of ascorbic acid, iron and copper in female guinea pigs. J Nutr. 110:1398-1408.

- HART, E., STEENBOCK, H., WADDELL, J., ELVEHJEM, C. 1928. Iron in nutrition. 7. Copper as a supplement to iron for haemoglobin building in the rat. J. Bio. Chem., 77:797-812.
- HEDEMANN, M., JENSEN, B. y POULSEN, H. 2006. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. J Anim Sci. 84:3310-3320
- HILL, C. y MATRONE, G. 1970. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. Fed Proc. 29:1474-81.
- HODGKINSON, V. y PETRIS, M. 2012. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. J. Biol. Chem. 287: 13549-55.
- INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM. 2002. *Cavia porcellus* Guinea Pig. [Internet]. [Acceso 20 julio 2012]. Disponible en: <http://www2.isis.org/Pages/Home.aspx>
- IQBAL, R., MALIK, F., AZIZ, T., SARFRAZ, I, AHMED, Z. y SHAFQAT, S. 2012. The study of histopathological changes upon exposure to vinegerized copper sulphate in liver and kidney of broiler chick. Middle-East J. Sci. Res. 12:36-41.
- JOHNSON, M. y MURPHY, C. 1988. Adverse effects of high dietary iron and ascorbic acid on copper status in copper-deficient and copper-adequate rats. Am J Clin Nutr. 47:96-101.
- JOHNSON, E., NICHOLSON, J. y DOERR, J. 1985. Effect of dietary copper on litter microbial population and broiler performance. British Poultry Science. 26:171-177.

- KLEVAY, L. 2000. Cardiovascular disease from copper deficiency – A history. *J. Nutr.* 130:489S-492S.
- LEE, R., RAINS, T., TOVAR-PALACIO, C., LEE, J. y SHAY, N. 1998. Zinc deficiency increases hypothalamic neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA levels and does not block neuropeptide Y-induced feeding in rats. *J. Nutr.* 128:1218-1223.
- LEE, J., PEÑA, M., NOSE, M. y THIELE, D. 2002. Biochemical characterization of the human copper transporter CTR1. *J. Bio. Chem.* 277: 4380-4387.
- LÖNNERDAL, B. 1996. Bioavailability of copper. *Am J Clin Nutr.* 63:821S-9S.
- LÖNNERDAL, B. 2008. Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 88:846S-50S
- LUO, X., LIN, J., STEWARD, Y., LU, F., LIU, L. y YU, S. 2005. Effects of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on broiler performance, relative copper bioavailability, and oxidation stability of vitamin E in feed. *Poult Sci.* 84:888-893.
- MERCER, J y LLANOS, R. 2003. Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals. *J. Nutr.* 133:1481S-1484S.
- MULLER, P. y KLOMP, L. 2008. Novel perspectives in mammalian copper metabolism through the use of genome-wide approaches. *Am J Clin Nutr.* 88:821-5S.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1995. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. 4ta ed. National Academy Press, Washington, DC.
- NAVARRO, V. y SENIOR, J. 2006. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 354:731-9.

- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-117-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. 1994. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrofotometría de absorción atómica.
- PANG, Y.; PATTERSON, J.A. y APPELATE, T.J. 2009. The influence of copper concentration and source on ileal microbiota. *Poult Sci.* 88:586-592.
- PĂUNESCU, A., PONEPAL, C., DRĂGHICI, O. y MARINESCU, A. 2010. Histopathological responses of the liver tissue of *Rana ridibunda* to the champions 50WP fungicide. *Annals. Food Sci and Tech.* 2:60-64.
- PÉREZ, V., WAGUESPACK, A., BIDNER, T., SOUTHEM, L., FAKLER, T., WARD, T., STEIDINGER, M. y PETTIGREW, J. 2011. Additivity of effects from dietary copper and zinc on growth performance and fecal microbiota of pigs after weaning. *J. Anim. Sci.* 89:414-425.
- PRATT, D. y KAPLAN, M. 2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med.* 17: 1266-1271.
- PROHASKA, J. 2008. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am j Clin Nutr.* 88:826S-9S.
- RADECKI, S., KU, P., BENNINK, M., YOKOYAMA, M. y MILLER, E. 1992. Effect of dietary copper on intestinal mucosa enzyme activity, morphology, and turnover rates in weanling pigs. *J Anim Sci.* 70:1424-1431.
- RAHMAN, Z., BESBASI, F., AFAN, A., BENGALI, E., ZENDAH, M., HILMY, M., MUKHTAR, M., JASPAL, S. y ASLAM, N. 2001. Effects of copper supplement on haematological profiles and broiler meat composition. *Int. J. Agri. Biol.* 2: 203-205.

- ROBERTS, E. y SARKAR, B. 2008. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Am. J. Clin. Nutr.* 88:851S-4S
- ROBBINS, K y BAKER, D. 1980. Effect of sulfur amino acid level and source on the performance of chicks fed high levels of copper. *Poul Sci.* 59:1246-53.
- R Development Core Team. 2006. R: A language and environment for statistical computing. . [Internet]. [Acceso 03 febrero 2013]. Disponible en: <http://www.R-project.org>.
- SAS Institute. 1990. SAS@ User's Guide Statistics. Version 6.04 edition. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- SCHUSCHKE, D. 1997. Dietary copper in the physiology of the microcirculation. *J. Nutr.* 127:2274-2281.
- SHIM, H. y HARRIS, Z. 2003. Genetic defects in copper metabolism. *J. Nutr.* 133:1527S-1531S.
- SHURSON, G., KU, P., WAXLER, G., YOKOYAMA, M. y MILLER, E. 1990. Physiological relationships between microbiological status and dietary copper levels in the pig. *J Anim Sci.* 68:1061-1071.
- SMITH, B., KING, J., LUCAS, E., AKHTER, M., ARJMANDI, B. y STOECKER, B. 2002. Skeletal unloading and dietary copper depletion are detrimental to bone quality of mature rats. *J. Nutr.* 132:190-196.
- TURNLUND, J., KING, J., GONG, B., KEYES, W. y MICHEL, M. 1985. A stable isotope study of copper absorption in young men: effect of phytate and α -cellulosa. *Am J Clin Nutr.* 42:18-23.

- TURNLUND, J., JACOB, R., KEEN, C., STRAIN, J., KELLEY, D., DOMEK, J., KEYES, W., ENSUNSA, J., LYKKESFELDT, J. y COULTER, J. 2004. Long-term high copper intake: effects on indexes of copper status, antioxidant status, and immune function in young men. *Am J Clin Nutr.* 79:1037-44.
- VONK, W., WIJMENGA, C. y VAN DE SLUIS, B. 2008. Relevance of animal models for understanding mammalian copper homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 88:840S-5S.
- WAPNIR, R. 1998. Copper absorption and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 67:1054S-60S.
- ZEA, O. 2011. Efecto de la suplementación con diferentes fuentes de cobre sobre el comportamiento productivo, morfometría intestinal y el nivel de cobre hepático en pollos de carne. Tesis MSc en Nutrición. Lima. Perú. UNALM. 103pp.
- ZHAO, J., HARPER, A., ESTIENNE, M., WEBB, K., McELROY, A. y DENBOW, D. 2007. Growth performance and intestinal morphology response in early weaned pigs to supplementation of antibiotic - free diets with an organic copper complex and spray - dried plasma protein in sanitary and nonsanitary environments. *J. Anim. Sci.* 85:1302-1310.
- ZHOU, W., KORNEGAY, E., VAN LAAR, H., SWINKELS, J., WONG, E. y LINDEMANN, M. 1994a. The role of feed consumption and feed efficiency in copper - stimulated growth. *J. Anim. Sci.* 72:2385-2394.
- ZHOU, W., KORNEGAY, E., LINDEMANN, M., SWINKELS, J., WELTEN, M. y WONG, E. 1994b. Stimulation of growth by intravenous injection of copper in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 72:2395-24

VIII. ANEXOS

ANEXO I: EFECTO DEL COBRE SOBRE EL PESO VIVO DE CUYES (g) A LOS 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, Y 56 DÍAS DEL PERIODO DE ENGORDE

TRATAMIENTOS	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 21	DÍA 28	DÍA 35	DÍA 42	DÍA 49	DÍA 56
T 1	369.6 ±75.0	434.1±86.9	523.2±86.2	600.0±97.8	685.4±101.1	755.6±110.2	831.0±107.7	902.9±109.8
T 2	350.6±31.2	425.2±34.6	497.1±38.0	577.7±57.3	646.3±62.1	725.7±66.0	795.3±70.8	868.3±67.4
T 3	383.3±24.3	449.4±24.4	513.2±26.2	600.5±24.3	673.1±34.0	753.4±48.0	845.7±51.6	911.5±61.7
T 4	380.2±62.1	447.8±66.2	528.2±68.7	604.1±75.3	677.5±87.6	760.7±84.4	847.8±91.9	920.6±90.8

T1: Grupo control; T2: 100 ppm; T3:200 ppm; T4: 300 ppm

43162

ANEXO II: PESO VIVO DE LOS CUYES (g) A LOS 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, Y 56 DÍAS DEL PERIODO DE ENGORDE

	DÍA 1	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 21	DÍA 28	DÍA 35	DÍA 42	DÍA 49	DÍA 56
T1R1	214.7	303.0	375.3	439.7	511.0	593.3	656.7	741.3	787.0
T1R2	339.7	405.7	455.7	542.0	624.7	708.0	775.7	830.0	915.3
T1R3	237.0	343.0	402.3	504.0	581.5	667.0	758.0	846.0	919.5
T1R4	252.0	313.3	361.7	469.0	527.5	611.5	660.5	736.0	822.5
T1R5	401.0	483.0	575.7	661.3	755.3	847.0	927.0	1001.7	1070.0
T2R1	240.0	318.0	389.0	452.7	515.3	585.0	651.3	702.0	776.0
T2R2	313.0	396.0	472.7	547.3	652.0	714.7	800.7	866.7	935.3
T2R3	267.0	356.0	437.0	523.7	622.7	708.7	779.3	853.0	911.7
T2R4	296.3	358.3	434.0	485.0	554.7	630.0	729.7	811.3	898.7
T2R5	226.3	324.7	393.3	476.7	543.7	593.3	667.7	743.6	819.7
T3R1	283.7	355.0	426.0	500.7	603.0	691.0	779.0	878.3	937.7
T3R2	292.7	381.7	434.7	480.7	561.7	614.0	668.3	756.3	805.0
T3R3	302.7	382.3	442.7	512.7	609.3	682.0	764.0	858.3	925.3
T3R4	320.3	375.7	455.0	520.3	600.0	679.3	777.0	883.3	965.0
T3R5	333.3	422.0	488.7	551.7	628.3	699.3	778.7	852.0	924.3
T4R1	309.3	384.7	431.7	487.3	550.3	603.3	685.0	752.3	821.7
T4R2	243.3	336.7	408.7	487.0	562.0	621.7	705.0	792.6	861.3
T4R3	327.0	388.7	460.7	563.7	648.7	742.7	833.3	930.6	1007.0
T4R4	365.0	476.0	554.7	632.7	715.7	798.7	869.7	960.6	1026.0
T4R5	235.0	315.0	383.3	470.3	544.0	621.3	710.3	802.6	887.0

ANEXO III: EFECTO DEL COBRE SOBRE LA GANANCIA DE PESO DIARIA DE CUYES (g) A LA SEMANA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 DEL PERIODO DE ENGORDE.

TRATAMIENTOS	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8
T 1	11.5±2.6	9.2±2.6	12.7±2.4	11.0±1.9	12.2±0.5	10.0±2.3	10.8±1.9	10.3±2.4
T 2	11.7±1.9	10.7±0.7	10.3±2.1	12.0±2.8	9.8±1.9	11.3±1.9	9.9±1.7	10.4±1.5
T 3	11.0±24.3	9.4±1.4	9.1±1.6	12.5±1.6	10.4±1.9	11.5±2.3	13.2±1.8	9.4±1.8
T 4	12.0±2.7	9.7±1.7	11.5±2.4	19.8±1.2	10.5±2.4	11.9±1.1	12.5±1.7	10.4±1.1

T1: Grupo control; T2: 100 ppm; T3:200 ppm; T4: 300 ppm

ANEXO IV: GANANCIA DE PESO DIARIA DE LOS CUYES (g) A LA SEMANA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 DEL PERIODO DE ENGORDE.

	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8
T1R1	88.3	72.3	64.3	71.3	82.3	63.3	84.7	46.0
T1R2	66.0	50.0	86.3	82.7	83.3	67.7	54.3	85.3
T1R3	106.0	59.3	101.7	77.5	85.5	91.0	88.0	73.5
T1R4	61.3	48.3	107.3	58.5	84.0	49.0	76.0	86.5
T1R5	82.0	92.7	85.7	94.0	91.7	80.0	74.7	68.3
T2R1	78.0	71.0	63.7	62.7	69.7	66.3	51.0	74.0
T2R2	83.0	76.7	74.7	104.7	62.7	86.0	66.0	68.7
T2R3	89.0	81.0	86.7	99.0	86.0	70.6	74.0	58.7
T2R4	62.0	75.7	51.0	69.7	75.3	99.7	81.6	87.3
T2R5	98.3	68.7	83.3	67.0	49.6	74.4	76.0	76.0
T3R1	71.3	71.0	74.7	102.3	88.0	88.0	99.3	59.3
T3R2	89.0	53.0	46.0	81.0	52.3	54.3	88.0	48.7
T3R3	79.7	60.3	70.0	96.7	72.7	82.0	94.3	67.0
T3R4	55.3	79.3	65.3	79.7	79.3	97.7	106.3	82.0
T3R5	88.7	66.7	63.0	76.7	71.0	79.4	73.3	72.3
T4R1	75.3	47.0	55.7	63.0	53.0	82.0	67.3	69.3
T4R2	93.3	72.0	78.3	75.0	60.0	83.3	87.7	68.7
T4R3	61.7	72.0	103.0	85.0	94.0	90.6	97.4	76.3
T4R4	111.0	78.7	78.0	83.0	83.0	71.0	91.0	65.3
T4R5	80.0	68.3	87.0	73.7	77.3	89.0	92.4	84.3

ANEXO V: EFECTO DEL COBRE SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO SEMANAL DE CUYES (g) A LA SEMANA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 DEL PERIODO DE ENGORDE.

TRATAMIENTO	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8
T 1	31.3±3.8	43.5±7.8	49.0±11.8	54.2±7.2	57.1±9.3	60.4±7.1	62.9±7.3	67.6±5.5
T2	29.7±0.9	42.4±3.9	49.1±2.7	51.9±4.0	53.1±5.2	59.7±4.7	61.0±3.1	66.0±3.2
T3	31.1±1.5	44.9±1.0	52.6±4.4	55.7±5.0	53.6±3.4	61.0±2.5	67.5±3.7	69.5±2.3
T4	31.4±2.2	45.0±6.1	56.2±14.2	54.2±7.2	53.8±6.5	62.4±5.0	67.8±7.6	71.9±6.9

T1: Grupo control; T2: 100 ppm; T3:200 ppm; T4: 300 ppm

ANEXO VI: CONSUMO DE ALIMENTO SEMANAL DE CUYES (g) A LA SEMANA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 DEL PERIODO DE ENGORDE.

	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8
T1R1	216.0	301.7	321.0	333.7	374.0	401.7	425.7	453.3
T1R2	209.3	288.3	417.3	389.3	400.7	410.7	396.0	448.3
T1R3	213.7	291.3	313.7	389.5	370.0	414.0	467.5	487.0
T1R4	193.7	245.7	231.0	331.5	342.5	380.0	396.5	442.0
T1R5	264.0	394.3	433.0	454.0	509.7	509.0	516.0	533.7
T2R1	215.3	268.3	363.0	356.7	328.0	379.0	399.3	454.0
T2R2	206.7	331.7	360.0	388.3	398.0	433.3	432.3	445.0
T2R3	212.0	318.7	348.0	395.7	418.3	455.0	456.0	497.0
T2R4	199.3	289.0	324.0	340.0	359.0	434.3	434.0	471.0
T2R5	208.7	278.0	324.7	336.3	354.0	387.7	415.0	443.7
T3R1	210.0	314.0	374.3	381.3	382.3	436.3	480.7	488.7
T3R2	220.3	323.7	348.3	362.7	335.3	401.3	433.7	460.7
T3R3	227.7	316.0	416.0	450.0	371.0	425.3	493.3	489.3
T3R4	203.7	311.7	365.7	388.3	390.3	447.7	496.0	504.0
T3R5	226.0	306.7	336.0	368.3	395.7	422.7	459.3	490.7
T4R1	204.3	264.0	266.7	294.0	329.3	381.0	387.7	422.7
T4R2	223.0	370.0	533.0	416.0	352.3	446.3	522.0	552.0
T4R3	224.7	320.0	439.3	404.0	427.3	474.0	513.0	523.7
T4R4	241.7	339.0	370.3	373.7	422.3	453.0	470.7	511.0
T4R5	204.3	282.7	358.7	408.7	350.3	430.3	479.7	508.3

ANEXO VII: EFECTO DEL COBRE SOBRE LA CONVERSIÓN ALIMENTICIA SEMANAL DE CUYES (g) A LA SEMANA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 DEL PERIODO DE ENGORDE.

TRATAMIENTO	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8
T1	2.80±0.54	4.83±0.65	4.02±1.32	4.98±0.40	4.66±0.56	6.21±1.14	5.95±1.05	6.94±1.99
T2	2.59±0.41	3.98±0.21	4.95±1.06	4.65±0.80	5.56±1.11	5.35±0.78	6.27±1.02	6.46±1.19
T3	2.90±0.47	4.85±0.84	5.89±1.00	4.50±0.80	53.56±3.43	5.48±1.10	5.18±0.63	7.59±1.29
T4	2.69±0.56	4.72±0.62	4.94±1.07	5.00±0.50	5.25±0.77	5.29±0.66	5.46±0.36	6.96±0.93

T1: Grupo control; T2: 100 ppm; T3:200 ppm; T4: 300 ppm

ANEXO VIII: CONVERSIÓN ALIMENTICIA SEMANAL DE CUYES (g) A LA SEMANA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 DEL PERIODO DE ENGORDE.

	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8
T1R1	2.45	4.17	4.99	4.68	4.54	6.34	5.03	9.93
T1R2	3.17	5.77	4.83	4.71	4.81	6.07	7.29	5.25
T1R3	2.02	4.91	3.09	5.03	4.33	4.55	5.31	6.63
T1R4	3.16	5.08	2.15	5.67	4.08	7.76	5.25	5.11
T1R5	3.22	4.26	5.05	4.83	5.56	6.36	6.91	7.81
T2R1	2.76	3.78	5.70	5.69	4.71	5.72	7.88	6.14
T2R2	2.49	4.33	4.82	3.71	6.35	5.04	6.55	6.48
T2R3	2.38	3.93	4.02	4.00	4.86	6.44	6.19	8.47
T2R4	3.22	3.82	6.35	4.88	4.77	4.36	5.32	5.39
T2R5	2.12	4.05	3.90	5.02	7.13	5.21	5.46	5.84
T3R1	2.94	4.42	5.01	3.73	4.34	4.96	4.84	8.24
T3R2	2.48	6.11	7.57	4.48	6.41	7.39	4.93	9.47
T3R3	2.86	5.24	5.94	4.66	5.11	5.19	5.23	7.30
T3R4	3.68	3.93	5.60	4.87	4.92	4.58	4.66	6.17
T3R5	2.55	4.60	5.33	4.80	5.58	5.32	6.27	6.78
T4R1	2.71	5.62	4.79	4.67	6.22	4.66	5.76	6.10
T4R2	2.39	5.13	6.80	5.55	5.90	5.36	5.95	8.04
T4R3	3.64	4.44	4.27	4.75	4.54	5.23	5.27	6.86
T4R4	2.18	4.30	4.75	4.50	5.09	6.38	5.17	7.82
T4R5	2.55	4.14	4.12	5.55	4.53	4.84	5.19	6.03

ANEXO IX: CONCENTRACIÓN DE COBRE EN EL HIGADO (ppm).

	T1	T2	T3	T4
R1	97.3	101.5	131.0	235.0
R2	80.0	110.0	112.0	245.0
R3	50.0	90.0	120.0	220.0
R4	60.0	100.5	109.5	232.0
R5	75.0	98.0	122.0	240.0

ANEXO X: CONCENTRACIÓN DE COBRE EN HECES (ppm).

	T1	T2	T3	T4
R1	118.0	262.5	425.0	525.0
R2	64.5	280.0	410.0	750.0
R3	93.5	230.0	415.0	615.0
R4	85.0	250.0	418.0	680.0
R5	90.2	248.0	427.0	620.0

ANEXO XI: MEDIDAS A NIVEL DEL YEYUNO MEDIO (μm).

	LONGITUD DE VELLOSIDAD (μm).	PROFUNDIDAD DE CRIPTA	RELACIÓN V/C
T1R1	1005.0	235.0	4.28
T1R2	990.0	223.0	4.44
T1R3	1012.0	247.0	4.10
T1R4	1002.0	240.0	4.18
T1R5	988.0	232.0	4.26
T2R1	820.0	218.0	3.76
T2R2	810.0	220.0	3.68
T2R3	833.0	211.0	3.95
T2R4	828.0	205.0	4.04
T2R5	885.0	216.0	4.10
T3R1	605.0	180.0	3.36
T3R2	620.0	165.0	3.76
T3R3	598.0	163.0	3.67
T3R4	601.0	172.0	3.49
T3R5	607.0	161.0	3.77
T4R1	414.0	173.0	2.39
T4R2	412.0	164.0	2.51
T4R3	426.0	159.0	2.68
T4R4	435.0	182.0	2.39
T4R5	421.0	180.0	2.34

43162

ANEXO XII: EVALUACIÓN HISTOLOGÍA DEL TEJIDO HEPÁTICO

TRAMIENTO	SCORE
T1R1	0
T1R2	0
T1R3	0
T1R4	0
T1R5	0
T2R1	0
T2R2	0
T2R3	0
T2R4	0
T2R5	0
T3R1	1
T3R2	0
T3R3	0
T3R4	1
T3R5	0
T4R1	1
T4R2	1
T4R3	0
T4R4	1
T4R5	1

Grados de lesión: 0: no presencia de daño tisular; 1: degeneración tisular y congestión sanguínea; 2: necrosis focal; 3: necrosis multifocal.