

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Veterinarias

Lugar donde se realizó el trabajo: General Pico, La Pampa

Área: Nutrición Animal

Tesis de Doctorado

“Comparación de una fuente inorgánica y una fuente orgánica de zinc en ovinos”

Autor: Guillermo H. Pechin

Director de Tesis: Néstor P. Stritzler, Ph.D.

2015

Dedicada a mis padres, que me enseñaron con el ejemplo, a mi esposa, por su amor y constante apoyo, y a mis hijos, la razón por la cual doy gracias a la vida cada día.

Agradecimientos

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Ph.D. Néstor Stritzler por su guía y apoyo en la segunda etapa de mi trabajo de tesis, y al Dr. Carlos Corbellini por su dedicación a lo largo de la primera etapa del mismo.

Mi agradecimiento, también, a la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Pampa) por el financiamiento del trabajo de investigación.

Mi reconocimiento a la Lic. Susana Cseh, de INTA Balcarce, por su gran aporte desde las tareas de laboratorio, al Lic. Francisco Babinec, por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los datos, y a los becarios de investigación que colaboraron en las tareas de campo.

Finalmente, quiero agradecer a la Comisión de Doctorado de la Universidad de Buenos Aires, sin cuya comprensión no podría haber finalizado con éxito mi tesis.

ÍNDICE

Capítulo I: Revisión Bibliográfica	1
Introducción	1
Propiedades químicas y funciones del zinc en el organismo	1
Enzimas	2
Hormonas	4
Membranas biológicas	4
Sistema inmunitario	6
Vitamina A	6
Regulación de la expresión génica	7
Absorción y metabolismo	8
Transportadores de zinc	8
Absorción	15
Factores que afectan la absorción del zinc	19
Dinámica del Zn en el tracto gastrointestinal de los rumiantes	22
Transporte	24
Captación tisular y almacenamiento	24
Excreción	26
Control homeostático y homeorréctico del metabolismo del zinc	27
Requerimientos nutricionales	35
Contenido de zinc en los alimentos	35
Deficiencia de zinc y ensayos de suplementación	36
Anorexia	36
Apoptosis	38
Diabetes	39
Crecimiento	40
Sistema inmunitario	41
Reproducción	44
Ensayos de suplementación en animales de interés productivo	46
Toxicidad	48
Evaluación del status de zinc y diagnóstico de la deficiencia	49
Productos disponibles para la suplementación con zinc	51
Comentarios finales	55
Capítulo II. Desarrollo de un modelo de deficiencia subclínica de zinc en ovinos	56
Introducción	56
Hipótesis	60
Objetivos	60
Materiales y Métodos	61
Resultados	66
Discusión	77
Conclusiones	80
Anexo del Capítulo II	81

Capítulo III: Biodisponibilidad relativa del zinc a partir de un complejo aminoácidos-Zn con respecto a la fuente patrón (sulfato de Zn) en corderos	84
Introducción	84
Hipótesis	92
Objetivos	93
Materiales y Métodos	93
Resultados	95
Discusión	113
Conclusiones	116
Capítulo IV: Discusión general	117
Referencias bibliográficas	121

Abreviaturas

ACTH: adrenocorticotrofina.
ADN: ácido desoxiribonucleico.
ARN: ácido ribonucleico.
BDR: biodisponibilidad relativa.
DTM: dominio transmembrana.
EAA: espectrofotometría de absorción atómica.
FA: fosfatasa alcalina.
GDP: ganancia diaria de peso.
GH: hormona de crecimiento.
GR: glóbulos rojos.
H-E: hematoxilina-eosina.
IBR: rinotraqueítis infecciosa bovina.
IGF-I: factor de crecimiento I similar a la insulina.
IWTO: International Wool Textile Organization.
LPS: lipopolisacáridos.
MAP-K: proteína quinasa activada por mitógenos.
MS: materia seca.
MT: metalotioneína.
NK: natural killer.
NPV: núcleo paraventricular.
NPY: neuropéptido Y.
NRC: National Research Council.
PKC: proteína kinasa C.
SLC: solute-linked carrier.
Zip: Zrt- and Irt-like proteins.

Resumen

Con los objetivos de: 1) desarrollar un modelo de deficiencia subclínica de zinc (Zn) en ovinos y 2) estimar la biodisponibilidad relativa (BDR) del Zn en un complejo Zn-aminoácidos con respecto al sulfato de Zn (ZnSO_4) para ovinos en crecimiento, se llevaron a cabo dos ensayos.

En el primer ensayo, 10 corderos de raza Corriedale, con un peso promedio de 10,09 kg de peso, fueron asignados aleatoriamente a dos grupos: Basal (B) y Suplementado con Zn (Z). La dieta B contenía 10 ppm de zinc (Zn), base materia seca (MS), y la dieta Z fue suplementada con ZnSO_4 , para aportar un nivel extra de 30 ppm de Zn. El ensayo se extendió por el término de 5 meses, período durante el cual los animales se pesaron mensualmente. También con esta periodicidad, fueron sangrados de vena yugular, para la posterior medición de parámetros hematológicos y de los niveles de Zn, Cu y fosfatasa alcalina (FA) en plasma. A los 45 días y hacia el final del período experimental, se realizaron ensayos de balance de Zn, Cu y nitrógeno (N). Posteriormente, se procedió al sacrificio de los animales y se recogieron muestras de músculo (longissimus dorsi, supraescapular y semimembranoso), hígado, páncreas, testículo, riñón, pulmón, hueso (metacarpo y metatarso) y lana para la determinación de los niveles de Zn y Cu. Por otro lado, también se tomaron muestras de piel (zonas del flanco y del vientre), hueso (metacarpo y metatarso, tercios distales), testículo, páncreas y del epitelio de lengua, esófago, rumen y vejiga para ser procesadas histológicamente. La ganancia de peso y la calidad de la lana fueron similares en ambos grupos, mientras que la producción de lana fue superior en el grupo Z. Los niveles de Zn plasmático fueron significativamente mayores en el grupo Z que en el grupo B, pero los niveles de FA plasmática, el hematocrito, la concentración de hemoglobina, y el número de glóbulos rojos, leucocitos y linfocitos en sangre no difirieron entre grupos. Las cupremias tendieron ($p < 0,10$) a ser mayores en el grupo B. De acuerdo al primer ensayo de balance, las retenciones de Zn y de N fueron significativamente mayores en el grupo Z. La retención porcentual de Zn en grupo B fue mayor y mostró la puesta en marcha de los mecanismos homeostáticos. La retención de Cu tendió ($p < 0,10$) a ser mayor en el grupo B. En el segundo ensayo de balance los resultados (Zn, Cu y N) fueron similares.

En el segundo ensayo, 20 corderos Corriedale, con un peso de 15,3 kg fueron asignados en forma aleatoria a cinco grupos: Basal (dieta con 10 ppm de Zn), suplementados con ZnSO_4 y con un complejo Zn-aminoácidos para proveer, en ambos casos, niveles adicionales de 10 y 20 ppm. Con los animales, se trabajó con una metodología similar al primer ensayo. Para la determinación de la BDR del Zn a partir del complejo Zn aminoácidos en comparación con ZnSO_4 fueron elegidas las cinco variables que respondieron, en las dos fuentes, con incrementos lineales al aumento de la dosis de Zn. Las mismas fueron: Zn aparentemente digerido (períodos 1 y 2), retención de Zn (períodos 1 y 2) y Zn hepático. Si bien, en los cinco casos la pendiente del complejo Zn aminoácidos fue numéricamente mayor que la de la fuente patrón (BDR entre 105 y 125), las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas.

Tomados en su conjunto, los resultados de ambos trabajos demuestran la validez del modelo de deficiencia de Zn, en el que varios indicadores pueden ser utilizados en ensayos de BDR. Bajo las condiciones de nuestro ensayo, la BDR del Zn a partir del complejo Zn aminoácidos no parece ser mayor a la del ZnSO_4 .

Summary

With the objectives of: 1) to develop a model of subclinical zinc (Zn) deficiency in sheep, and 2) to estimate the relative bioavailability (RBA) of Zn from a Zn amino acids complex relative to Zn sulfate (ZnSO_4) in lambs, two trials were carried on.

In the first experiment, 10 Corriedale lambs with an average weight of 10.09 kg were randomly assigned to two groups: Basal (B) and Supplemented with Zn (Z). Diet B contained 10 ppm of Zn, dry matter (DM) basis, and the Z diet was supplemented with ZnSO_4 , to provide an extra level of 30 ppm Zn. The trial lasted for five months, during which the animals were weighed monthly. Also with this periodicity, they were bled from the jugular vein for subsequent measurement of hematological parameters and Zn, Cu and alkaline phosphatase (ALP) concentration in plasma. At 45 days and at the end of the experimental period, Zn, Cu and nitrogen (N) balance assays were performed. Subsequently, we proceeded to the slaughter of animals and samples of muscle (longissimus dorsi, suprascapular and semimembranosus), liver, pancreas, testis, kidney, lung, bone (metacarpus and metatarsus) and wool were collected for Zn and Cu determination. In addition, skin samples (flank and belly zones), bone (metacarpal and metatarsal distal thirds), testis, pancreas and epithelium of tongue, esophagus, rumen and bladder were also taken to be histologically processed. Weight gain and wool quality were similar in both groups, while wool production was higher in the Z group. Plasma Zn levels were significantly higher in the Z group than in the B group, but ALP plasma levels, hematocrit, hemoglobin concentration, and erythrocytes, leukocytes and lymphocytes in blood did not differ between groups. The plasma Cu tended ($p < 0.10$) to be higher in group B. According to the first trial balance, Zn and N retention were significantly higher in the group Z. The percent retention of Zn in group B was increased and it showed the activation of homeostatic mechanisms. Cu retention tended ($p < 0.10$) to be higher in group B. In the second trial balance the results (Zn, Cu and N) were similar.

In the second experiment, 20 Corriedale lambs, weighing 15.3 kg, were randomly assigned to five groups: Basal (diet with 10 ppm Zn), supplemented with ZnSO_4 and a Zn-amino acid complex to provide, in either case, additional levels of 10 and 20 ppm. With animals, we worked with a methodology similar to the first experiment. For the determination of the RBA of Zn from Zn amino acid complex compared to ZnSO_4 were chosen five variables linearly respondents, in the two sources, to increasing doses of Zn. They were apparently digested Zn (periods 1 and 2), Zn retention (periods 1 and 2) and liver Zn. Although in all five cases the slope of Zn amino acid complex was numerically greater than that of the standard source (RBA between 105 and 125), the differences were not statistically significant.

Taken together, the results of both studies demonstrate the validity of Zn deficiency model, in which various indicators can be used in assays of RBA. Under the conditions of our assay, the RBA of Zn from Zn amino acid complex does not appear to be higher than that of ZnSO_4 .

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Introducción

Ya en 1869, Raulin demostró que el zinc (Zn) es requerido para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger* (Valle, 1986). Las pruebas inequívocas de que el Zn es un nutriente esencial para los animales fueron obtenidas, por primera vez, por Todd et al. (1934), trabajando con ratas. Sin embargo, su importancia práctica para los animales de interés productivo no fue reconocida hasta 1955, a partir de los trabajos de Tucker y Salmon, realizados en cerdos.

La deficiencia de Zn ha sido producida en bovinos, bajo situaciones experimentales y utilizando dietas semisintéticas (Miller y Miller, 1960; Miller y Miller, 1962; Miller et al., 1965b; Ott et al., 1965). Los informes de casos de deficiencia clínica de Zn en bovinos bajo pastoreo son relativamente escasos. El primero de ellos fue realizado por Legg y Sears (1960) en la Guyana Británica. Posteriormente, Dynna y Havre (1963) informaron también casos en Noruega, Spais y Papasteriadis (1974) en Grecia y Al-Saad et al. (2011) en Irak.

La deficiencia experimental de Zn fue descrita por primera vez en ovinos por Ott et al. (1964) y en caprinos por Miller et al. (1964). También existen informes de casos de deficiencia clínica de Zn ocurridos naturalmente en ovinos (Pierson, 1966; Nelson et al., 1984; Al-Saad et al., 2010) y en caprinos (McDowell, 1992).

La deficiencia de Zn es un tema de relevancia mundial en la nutrición de los seres humanos, y los alimentos de origen animal son una fuente importante del mineral. En grandes zonas del planeta, y, en especial, el África subsahariana y el sur de Asia, los habitantes consumen dietas con insuficiente contenido de Zn, lo que se ha relacionado con menores tasas de crecimiento en niños de menos de 5 años (Wessells y Brown, 2012).

Propiedades químicas y funciones del zinc en el organismo

Las lesiones, los signos clínicos y las consecuencias productivas de una deficiencia de Zn pueden explicarse a partir las innumerables funciones que cumple este mineral en el organismo animal. A su vez, estas funciones biológicas del Zn están asentadas en las características químicas únicas del mismo.

El Zn tiene un número atómico de 30 y un peso atómico de 65,37 y se encuentra, en la tabla periódica, al fin de la serie de los elementos de transición, en el grupo IIB. Se presenta como catión divalente, pero sus propiedades químicas son largamente dependientes de la posesión del orbital 3d completo. Esto hace que no participe de reacciones de oxidación-reducción en los sistemas biológicos, como aceptor o donante de electrones (Chesters, 1978), sino como un ácido de Lewis, en funciones que requieren un catalizador de este tipo, como la proteólisis o la hidratación del dióxido de carbono. Así, se marca una diferencia con otros metales, por ejemplo, el cobre (Cu), que existe en dos estados de oxidación, como iones cuproso y cúprico (Cu^+ y Cu^{++}), y que forma parte de un conjunto de enzimas, llamadas oxidasas.

Una propiedad importante que hace al Zn un cofactor catalítico conveniente es que el intercambio del ligando es rápido y permite, por lo tanto, una rápida disociación del producto y un recambio eficiente (McCall et al., 2000).

El Zn, además, tiene tendencia a formar uniones coordinativas relativamente estables con ligandos electronegativos como el nitrógeno (N, usualmente, con la histidina de cadenas polipeptídicas), el azufre (S, generalmente, de la cisteína) y el oxígeno (del aspartato o del glutamato), brindando rigidez a los dominios estructurales de algunas proteínas (Zubay, 1998).

Enzimas

El Zn forma parte de casi 300 metaloenzimas en diferentes especies (Vallee y Auld, 1990). Los ejemplos más importantes de Zn metaloenzimas y su función específica se detallan en la tabla siguiente (Zubay, 1998; Underwood y Suttle, 1999; McCall et al., 2000):

Tabla I.1. Principales enzimas zinc dependientes y sus funciones.

Enzima	Función
Anhidrasa carbónica	formación de CO ₂
Alcohol deshidrogenasa	oxidación de alcoholes
Retinol deshidrogenasa	oxidación del retinol (vitamina A)
Fosfatasa alcalina	hidrólisis de grupos fosfato
Málico deshidrogenasa	ciclo de Krebs (malato \longleftrightarrow oxalacetato)
Láctico deshidrogenasa	piruvato \longleftrightarrow lactato (anaerobiosis)
Alfa manosidasa	hidrólisis de polímeros de manosa (glicoproteínas)
Glutámico deshidrogenasa	alfa-ceto glutarato + NH ₄ ⁺ \longrightarrow glutamato
Ácido aminolevulínico deshidratasa	síntesis del grupo hemo
Leucina aminopeptidasa	degradación de polipéptidos
Dipeptidasas	degradación de dipéptidos
Colagenasas	degradación de la matriz extracelular
Carboxipeptidasas A y B pancreáticas	digestión de las proteínas
ADN polimerasa	síntesis de ADN
ARN polimerasa	síntesis de ARN
Ribonucleasa	degradación de ARN
Cu-Zn superóxido dismutasa	antioxidante citosólico

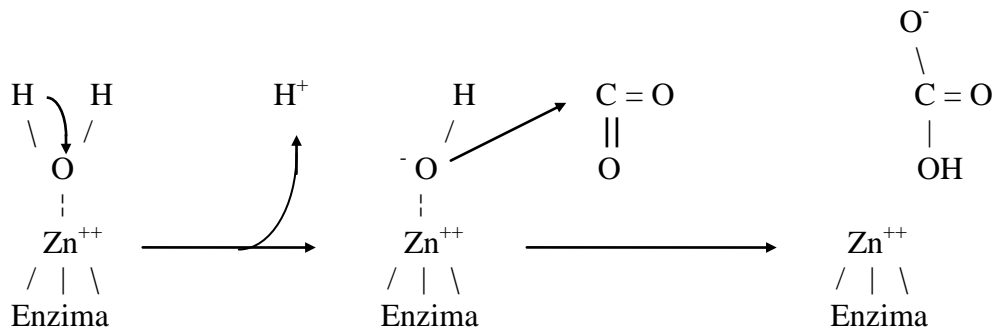
Con este panorama puede rápidamente comprenderse su vital papel en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los ácidos nucleicos, en la división celular, la reproducción, el funcionamiento del sistema inmunológico, el metabolismo de la vitamina A, el control de los radicales libres, etc.

A nivel enzimático, el Zn cumple 4 tipos de funciones: a) catalítica, b) cocatalítica, c) estructural y d) como regulador alostérico negativo.

Un ejemplo de la función catalítica del Zn es la anhidrasa carbónica de los eritrocitos. Esta enzima posee un átomo de Zn por molécula, lo cual corresponde a un contenido del 0,33 %, y la remoción del metal resulta en una completa inactivación de la enzima. La anhidrasa carbónica interviene en la reacción reversible $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. El ión Zn participa, probablemente, en el primer paso de la reacción. Básicamente, el Zn funciona como un ácido de Lewis, y se liga a la molécula de agua. Debido a la neutralidad del grupo imidazol de la

enzima, el complejo Zn-H₂O alcanza una acidez máxima, haciendo posible la ionización del H₂O a OH⁻, a pH 7. La reactividad del grupo nucleofílico OH⁻ es suficiente para que la anhidrasa carbónica ataque la molécula electrofílica CO₂. Como resultado, se forma el producto final HCO₃⁻. Se piensa que el Zn actúa de manera similar en otras metaloenzimas que contienen Zn en su sitio activo (Galdes y Vallee, 1983; Williams, 1989).

Figura I.1. Rol propuesto del Zn en la anhidrasa carbónica (Zubay, 1998).



Algunas enzimas contienen dos o más átomos de Zn (u otro metal), en las que un átomo de Zn ocupa un sitio catalítico y el resto, igualmente esenciales, se agrupan cercanamente en sitios cocatalíticos. Un ejemplo es la fosfatasa alcalina (FA), que contiene dos átomos de Zn y uno de magnesio (Mg). El primer ión Zn se une a una molécula de agua, necesaria para la catálisis, a dos histidinas y una glutamina, mientras que el segundo ión Zn y el Mg se unen a otros ligandos menos usuales, como serina, treonina, etc. Otros ejemplos similares son la fosfolipasa C, la nucleasa P1 (tres iones Zn) y la leucina aminopeptidasa (dos iones Zn) (Vallee y Auld, 1993).

El Zn tiene un rol estructural en el caso de la Cu-Zn superóxido dismutasa y se coloca en un sitio que no es esencial para la catálisis. En este caso un átomo del metal se une tetrahédricamente a los átomos de S de cuatro residuos cisteína y es necesario para mantener la estructura cuaternaria de la holoenzima. El rol catalítico está a cargo del Cu (Kirchgesner et al., 1993).

El Zn puede cumplir la dos funciones ya mencionadas en una misma enzima, por ejemplo, en la alcohol deshidrogenasa hepática. Ésta posee cuatro átomos de Zn por molécula: dos son esenciales para su actividad catalítica y dos son necesarios para estabilizar la estructura terciaria de la enzima (Chesters, 1978).

Finalmente, el Zn funciona como un regulador alostérico negativo en enzimas que no requieren metales para su actividad catalítica: fructosa 1,6-difosfatasa (neoglucogénesis), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (glucolisis), aldehído deshidrogenasa, caspasa-3 y proteína tirosina fosfatasa. La proteína tioneína tiene la capacidad de ligar estos átomos de Zn que se unen a sitios inhibitorios de las enzimas, y así aumentar la actividad enzimática, pero no puede remover el Zn de los sitios catalíticos (Maret et al., 1999).

No siempre es posible distinguir entre estas funciones. Una buena ilustración la proveen las ARN y ADN polimerasas. La función puede ser catalítica por unión al sustrato (iniciador o molde). Alternativamente, el Zn puede mantener la conformación, sin ser parte del sitio activo

de las enzimas. Una tercera posibilidad es que el Zn actúe de manera regulatoria proveyendo especificidad a las proteínas involucradas en la replicación y transcripción (Wu y Wu, 1983).

Hormonas

La **insulina** cristalina contiene cantidades sustanciales de Zn, y se han llevado a cabo varios estudios (la mayoría en ratas) sobre el rol del Zn en la síntesis, almacenamiento y secreción de la insulina, así como la interacción hormona-receptor y la respuesta final en órganos blanco (Jansen et al., 2009). La función del Zn es, fundamentalmente, proveer estabilidad a las uniones entre las cadenas polipeptídicas de la proteína, a nivel de los grupos sulfhidrilos. Una de las desventajas de las uniones disulfuro es que, en un ambiente reductor, el S de los aminoácidos azufrados puede ser protonado, lo que puede causar la ruptura de los puentes disulfuro, con la consecuente pérdida de la conformación de la proteína. Una segunda desventaja de los puentes disulfuro es que permiten poco movimiento alrededor de ellos y, por lo tanto, restringen la conformación de la proteína. Por el contrario, el Zn no puede ser reducido y no tiene tantas demandas estereoquímicas en la molécula (Williams, 1984). Así, el Zn brinda a las enzimas y otras proteínas Zn dependientes estabilidad conformacional a varios pH sin causar obstáculos estéricos (Swinkels et al., 1994).

El Zn parece tener relación con otras hormonas, como corticoides adrenales, gonadotrofinas, testosterona, hormona de crecimiento, etc. Flynn et al. (1972) han sugerido que la acción de la adrenocorticotrofina (ACTH) en corteza adrenal es Zn dependiente, ya que la ACTH es incapaz de estimular la síntesis de corticosteroides en ratas deficientes en Zn. La deficiencia marginal de Zn en ratas se asocia, también, a menores niveles circulantes de somatotrofina (Kirchgessner y Roth, 1985). En trabajos realizados con machos de distintas especies, la deficiencia de Zn produjo una disminución de la espermatogénesis y de la síntesis de testosterona por las células de Leydig (McDowell, 1992; Martin et al., 1994; Hamdi et al., 1997).

El rol del Zn en los efectos biológicos de las hormonas esteroides se relaciona directamente con la estructura de “dedos de Zn” de los receptores nucleares para este tipo de hormonas. Esta función del Zn, en relación a la acción de las hormonas, se tratará más adelante, en el ítem Regulación de la expresión génica.

Membranas biológicas

El Zn protege a los grupos sulfhidrilos de las proteínas de membrana del daño oxidativo (Kirchgessner et al., 1993). Se ha demostrado que la deficiencia experimental de Zn incrementa la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemólisis en presencia de soluciones hipotónicas de NaCl en ratas (O'Dell et al., 1987) y cerdos (Johanning et al., 1990a).

Varios estudios han demostrado que la deficiencia de Zn altera la composición de la membrana plasmática. Se han detectado cambios en el contenido lipídico: incremento en la relación colesterol:fosfolípidos, disminución del contenido de ácido linoleico y un aumento de oleico en fosfatidilcolina y fosfatidil-etanolamina (Johanning y O'Dell, 1989; Johanning et al., 1990b). En modelos celulares de linfocitos T, fibroblastos y células nerviosas la deficiencia de Zn se asocia con cambios apoptóticos y produce un incremento de la fluidez de membrana en la interface agua/lípido, que es debida a una translocación de fosfatidilserina desde la parte interna hasta ese sitio, y un aumento de la fluidez en la región hidrofóbica de la

membrana debida a un menor contenido de ácido araquidónico (Verstraeten et al., 2004), lo cual puede alterar la funcionalidad de la membrana plasmática. Avery y Bettger (1992) hallaron una disminución en el contenido de la proteína R5, pero no en el contenido de espectrina, la principal proteína del esqueleto de membrana, ni en su forma oligomérica.

La actividad de las enzimas asociadas con la membrana plasmática también es deprimida. La restricción del consumo asociada con la deficiencia de Zn fue el factor principal causante en la reducción relativa de la proteína RA (aduccina) y de la proteína R4. La deficiencia de Zn disminuyó la actividad catalítica de la Ca-ATPasa y de la 5' nucleotidasa en la membrana de eritrocitos de ratas y cerdos (Johannig et al., 1990b). Ruz et al. (1992) hallaron también una disminución de actividad de FA en la membrana de GR humanos.

La deficiencia de Zn en ratas ha sido asociada con un incremento en la tendencia al sangrado al parto, provocado por una alteración en la agregación plaquetaria (Gordon y O'Dell, 1980; Emery et al., 1990). La captación de Ca del medio extracelular es esencial para la iniciación de la agregación plaquetaria, y dicha función es limitada en plaquetas extraídas de ratas deficientes en Zn (Xia y O'Dell, 1995). Según el modelo actual (O'Dell, 2000), la menor captación de Ca se asocia a una menor actividad de la proteína quinasa C (PKC), una enzima Ca dependiente, y es esto lo que provoca de la disminución de la agregación plaquetaria.

Locomoción y postura anormales son signos clínicos de la deficiencia de Zn en conejillos de indias (O'Dell et al., 1990a) y pollos (O'Dell et al., 1990b) causados por una neuropatía periférica, caracterizada por una disminución de la velocidad de la conducción nerviosa y de la actividad de la ATPasa Na-K dependiente.

La deficiencia de Zn se asocia también a defectos en el funcionamiento del sistema nervioso central. El Ca sirve como segundo mensajero en membranas pre y postsinápticas. La captación presináptica de Ca ocurre vía canales sensibles al voltaje, mientras que la captación postsináptica de Ca es por vía de canales activados por glutamato. De una manera similar a lo que ocurre en las plaquetas, las vesículas sinápticas de cerebro preparadas a partir de animales deficientes en Zn exhibieron una reducción del 40 % en la captación de Ca cuando fueron estimuladas con el neurotransmisor glutamato (Browning y O'Dell, 1994).

Aparentemente, la captación de Ca es el defecto en común que ocasiona disturbios funcionales tanto en la membrana plasmática de los glóbulos rojos (GR) como en la de plaquetas y células nerviosas.

La hemólisis de los GR sujetos a estrés osmótico es el resultado de la captación de agua y el concomitante incremento de su volumen. La recuperación del volumen ocurre vía un mecanismo que involucra un canal de Ca sensible al estiramiento, lo que lleva indirectamente a la activación de un canal de K, Ca dependiente y, por lo tanto, a la pérdida de K y agua (Pierce y Politis, 1990). Para la activación del canal de K es necesario, entonces, un incremento en la captación de Ca, la que podría estar disminuida por una deficiencia de Zn. Por otro lado, como lo señalan Lauf y Mangor-Jensen (1984), los grupos sulfhidrilos son necesarios para el transporte de K en los GR de ovejas. Xia et al. (1999) demostraron que la concentración de grupos sulfhidrilos en la membrana de GR de ratas está inversamente correlacionada con la fragilidad osmótica. En este ensayo, las ratas deficientes en Zn tuvieron menores concentraciones de grupos sulfhidrilos y mayor hemólisis que las ratas control. La repleción con Zn durante 2 días restauró estos parámetros a valores normales. Esta rápida reversión de ambos defectos sugiere que son el resultado de una modificación post-traducciona l de algunas proteínas de membrana.

O'Dell (2000) propone que la disminución de la captación de Ca cuando las células son estimuladas por una señal extracelular, ya sea esta una hormona, un mitógeno o un estímulo físico, es producida por la falla de los canales de Ca, sulfhidrilo dependientes. En el modelo propuesto, un ión Zn se une con una relativamente baja afinidad a un grupo sulfhidrilo esencial. La afinidad de unión debe ser tal que el Zn se disocia cuando la concentración de Zn libre en ese microambiente cae a causa de una deficiencia de Zn. Así, en ausencia de Zn el grupo sulfhidrilo de una proteína de membrana crítica es rápidamente oxidado para formar un grupo disulfuro.

Por otro lado, existe un activo campo de investigación acerca la función del ión Zn como molécula de señalización en la regulación de la excitabilidad neuronal. Se han demostrado acciones del Zn sobre canales iónicos sensibles a ligandos (glutamato, ácido γ -aminobutírico, receptores P2X) y a voltaje, como ciertos canales de Ca, K y Na (Sandstead et al., 2000; Mathie et al., 2006; Paoletti et al., 2009).

Sistema inmunitario

El Zn cumple una serie de roles esenciales para el sistema inmunitario. Es necesario, por ejemplo, para mantener la estructura de la timulina, un nonapéptido con acción hormonal producido por el timo. La actividad de la timulina sérica decae en la deficiencia de Zn en humanos y animales (Prasad et al., 1988). Debido a ello, y, probablemente, al papel que cumple el Zn en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, la deficiencia de Zn produce toda una gama de disfunciones a nivel de la inmunidad celular y humoral (Fraker y King, 2004), los que se discutirán más adelante.

Vitamina A

La enzima Zn dependiente retinol deshidrogenasa (un tipo de alcohol deshidrogenasa) es esencial para la conversión de retinol en retinal, una reacción necesaria para la visión nocturna normal (Chesters, 1978). Además, el Zn parece intervenir en la síntesis de la proteína portadora de retinol (RBP, Retinol Binding Protein) y de la RBP celular (cRBP), las que permiten la movilización de la vitamina A desde las reservas hepáticas y la captación en los tejidos extrahepáticos, respectivamente (Smith et al., 1973; Parul y West, 1998). Los trabajos realizados en corderos (Saraswat y Arora, 1972) y cabras (Prasad y Arora, 1979; Chhabra y Arora, 1985) indican que la deficiencia de Zn se asocia a una disminución de retinol sérico. Sin embargo, otras investigaciones no han dejado en claro el real significado de estos hallazgos, ya que se demostró que la disminución de la vitamina A plasmática puede ser causada también por una restricción del consumo de alimento (Smith et al., 1976; Carney et al., 1976), por lo que el efecto de la deficiencia de Zn puede ser directo o indirecto. En los ensayos realizados en humanos y animales de experimentación, a pesar de los roles bioquímicos demostrados del Zn, ha sido difícil aislar el efecto de la deficiencia de Zn de aquel producido por una falla en la síntesis proteica causada por un déficit energético-proteico (Parul y West, 1998). Otros trabajos asocian las bajas concentraciones hepáticas y séricas de vitaminas A y E, halladas en animales privados de Zn, a una disminución de la absorción de lípidos (Kim et al., 1998). Este problema podría deberse a la menor síntesis de fosfolipasa A₂ pancreática, enzima que hidroliza la fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina, lo que lleva a una

menor formación y absorción de quilomicrones en intestino, y, por lo tanto, a una defectuosa absorción de lípidos y vitaminas liposolubles (Noh y Koo, 2001).

Regulación de la expresión génica

Los **factores de transcripción** son proteínas que se ligan a porciones específicas del ADN, e influyen de esta manera en la regulación de la expresión génica. Los sectores de esas proteínas que toman contacto con el ADN deben poseer una determinada estructura, estabilizada en muchos casos por el Zn, formando los **dedos de Zn** (“zinc fingers”). Esta estructura comprende un átomo de Zn ligado en forma tetrahédrica a los átomos de S de dos cisteínas y a los átomos de N de dos histidinas, conteniendo la cadena polipeptídica unos 30 aminoácidos. Las proteínas reguladoras poseen tres de estas estructuras repetidas, de manera que pueden unirse óptimamente a la doble hélice de ADN. Han sido reconocidas, hasta el momento, más de 200 proteínas regulatorias con estas estructuras en eucariotas, o el equivalente a alrededor del 3 % del genoma (Klug, 2010). La primera en ser identificada fue el factor de transcripción para la ARN polimerasa III (FTIII), el que se une a una región de control interna del gen del ARNr 5S. Los receptores para las hormonas esteroides (estrógenos, progesterona, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides) y para el ácido retinoico, el ácido cis-retinoico, el 1-25 (OH)₂ vitamina D₃ y las hormonas tiroideas contienen estructuras similares a dedos de Zn. Cada monómero del receptor contiene dos porciones plegadas, con un átomo de Zn cada una, unido a su vez a cuatro moléculas de cisteína. Cuando se produce la unión hormona-receptor ocurre la dimerización del receptor, y es así como se une a la doble hélice de ADN (Zubay, 1998; Klug, 2010). De esta manera, el Zn tiene una participación indirecta en la acción de un gran número de hormonas a nivel de las células blanco.

Actualmente se reconocen una variedad de proteínas que contienen estructuras con dedos de Zn de diferente tipo y otras llamadas proteínas RBR (“ring between ring fingers”), y que cumplen funciones de interacción proteína – proteína, y no solamente como factores de transcripción, por ejemplo en la transducción de señales, la regulación de la ubiquitinización, de la citoarquitectura, de la adhesión celular, etc. (Kadmas y Beckerle, 2004; Eisenhaber et al., 2007).

Existen Zn metaloenzimas que también intervienen en la expresión génica. Las **ARN polimerasas I, II y III** son esenciales para la síntesis de los ARN ribosomal, mensajero y de transferencia (Cramer et al., 2008). La **timidina quinasa**, que participa en la síntesis de la timidina trifosfato, la **ADN polimerasa**, que interviene en la replicación del ADN, y la **ribonucleasa**, que degrada los ácidos nucleicos, también son Zn metaloenzimas (Duncan y Hurley, 1978; Perederina et al., 2010; Sharif et al., 2012). Así, se comprende el rol fundamental del Zn en la síntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas, en la replicación y la diferenciación celular y en la reproducción.

Además, el Zn puede jugar un rol regulatorio de genes específicos. El ejemplo más conocido en mamíferos es la regulación de la expresión del gen de la **metalotioneína** (MT), una proteína que interviene, a su vez, en el metabolismo de algunos minerales, como el Cu y el Zn (Figura I.3). Para la regulación de la transcripción por medio de un metal se necesitan tres elementos (Cousins, 1994):

a) un elemento sensible al metal (“metal responsive element”, MRE) situado en la secuencia promotora, que se ubica corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción del gen. Este elemento sensible al metal tiene, generalmente, 13 a 15 pares de bases.

b) un factor de transcripción que se une al elemento sensible al metal (“metal responsive element-binding protein”, MRE-BP).

c) un metal inductor que se une mediante un enlace covalente coordinativo con el factor de transcripción. Blalock et al. (1988) concluyeron a partir de su trabajo en ratas que el Zn, a concentraciones fisiológicas, es un inductor más potente para el gen de la MT que el Cu. Además de la MT, el Zn puede estar implicado en la regulación transcripcional de otros genes.

Cuando se compararon dietas deficientes con dietas suficientes en Zn, este metal demostró ser un inductor de la síntesis de ARN mensajero de varias enzimas, no directamente relacionadas con el metabolismo del Zn: apolipoproteína A-1, aldolasa B, citocromo b, ubiquitina, citocromo c oxidasa, alfa amilasa pancreática, proteína portadora de ácidos grasos, colecistoquinina, uroguanilina, sintetasa inducible de óxido nitroso, receptor de citoquinas en células T, calreticulina, etc. (Shay y Cousins, 1993; Cousins et al., 2003). Por otro lado, existe evidencia creciente de que el Zn puede ser un regulador transcripcional negativo de algunos genes (Jackson et al., 2008).

Absorción y metabolismo

Transportadores de zinc

La cantidad de genes que codifican proteínas con motivos que ligan Zn ha sido estimada en más del 3 % del genoma humano. La ubicuidad de estas proteínas y la importancia de sus funciones explica porqué los organismos han desarrollado rutas específicas para regular homeostáticamente la disponibilidad de este micronutriente esencial en sitios celulares específicos a través de un conjunto de transportadores (Cousins et al., 2006).

Los transportadores de Zn se agrupan en dos familias: a) las proteínas ZnT, llamadas anteriormente CDF (Cation Diffusion Facilitator) y ahora SLC30 (Solute-Linked Carrier 30) y b) las Zip (Zrt- and Irt-like proteins), denominadas SLC39 (Solute-Linked Carrier 39) (Liuzzi y Cousins, 2004).

Las proteínas ZnT y Zip tienen roles opuestos en la homeostasis celular del Zn. Los ZnT reducen el Zn intracelular citoplasmático promoviendo el eflujo celular hacia afuera de la célula o el influjo hacia adentro de las organelas. Los transportadores Zip incrementan los niveles de Zn intracelular promoviendo el transporte desde el fluido extracelular o desde las vesículas intracelulares hacia el citoplasma (Lichten y Cousins, 2009, Jeong y Eide, 2013).

La investigación en torno a este tema ha progresado a partir de la aplicación de técnicas moleculares, tales como interferencia de ARN, transfección celular, análisis genómico y “noqueo” de genes.

Transportadores ZnT

Se conocen hasta el momento 10 transportadores de Zn en mamíferos pertenecientes a esta familia (ZnT1-10). El mecanismo de transporte específico que utilizan no se conoce con exactitud. La extrusión de Zn y el depósito vesicular de Zn ocurren frente a un gradiente de concentración del mineral. No se ha informado en células de mamíferos de un transporte activo

primario ligado a ATPasa, y es probable que funcionen como un transporte activo secundario, mediado por antiportadores, tal vez Na/Zn (Cousins et al., 2006; Sekler et al., 2007).

Existe una considerable homología de secuencia entre los miembros de esta familia. Las proteínas varían en tamaño, pero todas tienen 6 dominios transmembrana (DTM), con la excepción del ZnT5, que tiene 12. La mayoría tiene los extremos C y N dentro del citoplasma, y un lazo largo intracelular rico en histidina entre los DMT IV y V, que representa un dominio que liga Zn. Además, muestran 4 DTM anfipáticos que forman canales a través de los cuales el Zn puede ser translocado (Cousins et al., 2006).

ZnT1 (SLC30A1)

El ZnT1 fue el primer transportador de Zn de mamíferos en ser descubierto (Palmiter y Findley, 1995). Es considerado como un regulador primario del eflujo celular de Zn. Se localiza en vesículas y en la membrana basolateral de los enterocitos, y participa en la transferencia del Zn a la circulación (Cousins y McMahon, 2000). Esta localización fue confirmada por inmunohistoquímica (Yu et al., 2006) en esófago, duodeno y ciego de ratón. En riñón también tiene una orientación basolateral, más abundante en túbulo contorneado distal y el túbulo grueso ascendente, lo que sugiere un rol de recuperación de Zn a partir del filtrado glomerular y explica la alta capacidad reabsortiva del riñón en un amplio rango de consumo de Zn (Cousins y McMahon, 2000; Baer y King, 1984). Se sugiere un rol protector del ZnT1 en sistema nervioso central (SNC) y un rol en la regulación del Zn sináptico (Nitzan et al., 2002). El ZnT1 es abundante en la placenta, especialmente en la membrana del saco vitelino, y participa en la provisión de Zn de madre a feto (Cousins y McMahon, 2000). La mutación nula del ZnT1 produce letalidad embrionaria en ratón (Langmade et al., 2000). El ZnT1 es el exportador de Zn en leucocitos, pero otros miembros de la misma familia participan en diferentes subpoblaciones (Overbeck et al., 2008).

En la mayoría de los ensayos, la suplementación con Zn resultó en una inducción del ARNm de ZnT1, y, por el contrario, una disminución del Zn intracelular disponible utilizando un quelante (TPEN ó N, N, N', N'-tetrakis-(2-piridilmetil) etilendiamina) redujo marcadamente los niveles de ARNm de ZnT1. Este modo de respuesta es similar al del gen de la MT. La respuesta del ARNm del ZnT1 es lenta frente a bajos niveles de Zn comparada con la de otros transportadores de Zn. Luego del tratamiento de las células con TPEN la expresión de los otros genes de transportadores de Zn retorna a lo normal, pero la de ZnT1 permanece baja. Por lo tanto, es razonable hipotetizar que un mecanismo más conveniente de adaptación celular a la baja disponibilidad de Zn es reducir los niveles de ZnT1, por lo tanto el eflujo, antes que mantener altos niveles de expresión de importadores de Zn (Liuzzi y Cousins, 2004). El ZnT1 y la MT trabajan en concierto para incrementar la resistencia a los altos niveles de Zn, pero el ZnT1 juega un rol más importante en regular los niveles de Zn libre dentro de las células (Palmiter, 2004).

Este modo de respuesta general del ZnT1 puede variar en intestino. El transportador ZnT1 es expresado en membrana basolateral de los enterocitos (con mayor abundancia en duodeno y yeyuno), y media el transporte de Zn desde el enterocito a la sangre. Se demostró que, en respuesta a la manipulación dietaria en ratas, ZnT1 aumenta sus niveles con la suplementación con Zn, pero no se modifica con la restricción (McMahon y Cousins, 1998).

ZnT2 (SLC30A2)

A diferencia del ZnT1, el ZnT2 está localizado en vesículas intracelulares. El ARNm de este transportador ha sido localizado en algunos tejidos: intestino delgado, riñón, placenta, páncreas, testículos, vesículas seminales y glándula mamaria. La expresión de ZnT2 en intestino delgado y riñón de rata responde altamente al Zn. La deficiencia de Zn reduce el ARNm de ZnT2 a niveles indetectables y la suplementación con Zn produce una marcada inducción del ARNm de ZnT2 (Liuzzi et al., 2001). La asociación del ZnT2 con altas concentraciones celulares de Zn y su localización vesicular en células acinares del páncreas sugiere que este transportador puede funcionar a través de un camino exocítico, antes de la incorporación de Zn en proteínas pancreáticas secretadas para controlar las pérdidas endógenas (Liuzzi et al., 2003).

Además, el ZnT2 es uno de los transportadores responsables de la secreción del Zn en la leche (Lönnerdal, 2007).

ZnT3 (SLC30A3)

Este transportador fue identificado en corteza cerebral, hipocampo, médula espinal, testículo y timo. Los patrones de expresión del transportador en el cerebro de ratón adulto coinciden con neuronas glutaminérgicas que contienen Zn dentro de las vesículas sinápticas, especialmente del hipocampo, y se sugiere que el ZnT3 está localizado en la membrana de estas vesículas (Lichten y Cousins, 2009). Sin embargo, el rol del Zn en la regulación de la neurotransmisión, no es suficientemente comprendido en la actualidad, a pesar de décadas de investigación (Tóth, 2012).

ZnT4 (SLC30A4)

Las hembras de ratón con una simple mutación en el gen ZnT4 (genotipo *lm*, lethal milk) producen leche con un bajo contenido en Zn y sus crías mueren de deficiencia de Zn postnatal (Ackland y Mercer, 1992). Esto señala la importancia del ZnT4 en la incorporación del Zn en la leche. Además, la restricción de Zn incrementa la expresión de ZnT4 en glándula mamaria (Kelleher y Lönnerdal, 2002). La absorción y el metabolismo del Zn de las crías parece ser normal, pero más tardíamente, hacia los 8 meses de edad, estos animales comienzan a exhibir signos clínicos de deficiencia de Zn (Erway y Grider, 1984). Además de glándula mamaria, ZnT4 es expresado en cerebro, intestino delgado y riñón, localizándose en vesículas intracelulares y en la red transgolgi. A pesar de la localización en intestino, no parece ser esencial para la normal absorción de Zn (Liuzzi y Cousins, 2004).

ZnT5 (SLC30A5)

El transportador hZTL1 en humanos, luego llamado hZnT5, con una localización en membrana apical de los enterocitos, fue descubierto, al mismo tiempo, por Cragg et al. (2002) y por Kambe et al. (2002). Los autores proponen que puede mediar la captación de Zn a través de la membrana plasmática. Sin embargo, su importancia fisiológica en la absorción de Zn no está elucidada. El ARNm de ZnT5 es expresado en páncreas endócrino, ovario, próstata, testículo, riñón y cerebro, pero su localización es en sistema de vesículas y no en la membrana plasmática. El ZnT5 fue encontrado en las células β del páncreas, por lo que se propuso como un transportador de Zn hacia adentro de las vesículas de almacenamiento de insulina, ricas en Zn (Kambe et al., 2002).

El ZnT5 interactúa con el ZnT6 para formar un complejo que puede transportar Zn en un camino secretorio (Ellis et al., 2005). Así, la formación de complejos hetero-oligoméricos ZnT5/ZnT6 se considera esencial para sus funciones, ya que ambos genes tienen que ser expresados para activar la FA no específica de tejido (Suzuki et al., 2005).

ZnT6 (SLC30A6)

Las mayores concentraciones de ARNm de ZnT6 se encuentran en hígado, pulmón, riñón, cerebro e intestino delgado. La localización intracelular inmunológicamente detectable de ZnT6 muestra que colabora en el transporte del Zn citoplasmático hacia adentro el aparato de Golgi y las vesículas (Lichten y Cousins, 2009).

ZnT7 (SLC30A7)

El ARNm de ZnT7 es expresado en intestino delgado, hígado, bazo, riñón, corazón, cerebro y pulmón. El ZnT7 se localiza en vesículas perinucleares. Su sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) llevó a la acumulación de Zn vesicular en la región perinuclear cuando el Zn en el medio era incrementado, lo que sugiere que el ZnT7 puede transportar el Zn hacia adentro de las vesículas para reducir el Zn citoplasmático (Kirschke y Huang, 2003). Los ratones con el gen ZnT7 “noqueado” desarrollan deficiencia de Zn y respuesta a la suplementación dietaria. Estos ratones deficientes muestran un pobre crecimiento y menor acumulación de grasa, lo que sugiere que el ZnT7 juega un rol crítico en mantener la homeostasis celular del Zn y puede estar involucrado en la regulación de la composición corporal (Huang et al., 2007).

ZnT8 (SLC30A8)

La insulina es almacenada en vesículas secretorias en las células β del páncreas como un hexámero unido con dos átomos de Zn^{++} y es liberada por exocitosis en respuesta a estímulos externos, tales como una elevada concentración de glucosa. Cuando ocurre la exocitosis, los gránulos de insulina se funden con la membrana celular, liberando la insulina y el Zn a la circulación (Qian et al., 2000). Posteriormente, se ha identificado el transportador específico de los islotes de Langerhans (denominado ZnT8), que facilita la acumulación de Zn desde el citoplasma hacia adentro de las vesículas intracelulares (Chimienti et al., 2004; Lemaire et al., 2012).

ZnT9 (SLC30A9)

La evidencia sugiere que el ZnT9 es translocado desde el citoplasma al núcleo durante la fase S y que interactúa con varias proteínas mitóticas (Sim et al., 2002), pero no se ha demostrado su rol como transportador.

ZnT10 (SLC30A10)

El ZnT10 ha sido encontrado limitado a hígado y cerebro fetales, por lo que se especula que podría jugar un rol importante durante el desarrollo fetal, pero hasta el momento no se han llevado estudios para analizar su función (Lichten y Cousins, 2009).

Transportadores ZIP

La familia Zip está integrada por 14 miembros, hasta el momento (Lichten y Cousins, 2009). La mayoría de las proteínas Zip tiene 8 DTM, con las terminaciones amino y carboxilo extracelulares (o intravesiculares). Una característica común es un largo lazo, rico en histidina, entre los DTM III y IV y un muy corto extremo C. Probablemente sean los DTM IV y V los implicados en el paso de los cationes Zn (Liuzzi y Cousins, 2004). El mecanismo de transporte mediado por Zip no es bien conocido. La captación de Zn puede ser un proceso facilitado dirigido por un gradiente de concentración, pero se ha sugerido también un mecanismo de cotransporte (Cousins et al., 2006; Eide, 2006; Lin et al.; 2010).

Zip1 (SLC39A1)

La sobreexpresión del transportador Zip1 en células de eritroleucemia K562 incrementó la captación de Zn^{65} , localizándose en membrana plasmática (Gaither y Eide, 2001b). El ARNm de Zip1 es abundantemente expresado en varios tejidos de ratón, pero no en páncreas. Sin embargo, la abundancia de ARNm de Zip1 en intestino no es regulada por el Zn dietario, por lo que no estaría involucrado en el proceso de absorción de Zn (Gaither y Eide, 2001a; Dufner-Beattie et al., 2003b). En células mononucleares THP-1, el transportador Zip1 aumentó ligeramente en la depleción aguda de Zn y disminuyó con la suplementación con Zn (Cousins et al., 2003). Coincidentemente, Wang et al. (2004), hallaron que la deficiencia de Zn disminuyó la tasa de endocitosis de Zip1 y de Zip3, e incrementó los niveles de estos transportadores en membrana plasmática de células BHK transfectadas y la captación de Zn. Esto señala que la endocitosis de los transportadores Zip puede jugar un rol en el control homeostático de la reabsorción de Zn. El “noqueo” del gen de Zip1 en ratón no produjo ningún efecto aparente cuando el consumo de Zn fue normal, pero puede afectar adversamente la supervivencia embrionaria cuando el consumo de Zn es limitante (Dufner-Beattie et al., 2006).

Zip2 (SLC39A2)

Al igual que el anterior, la sobreexpresión de Zip2 en células embrionarias renales humanas incrementó la captación de Zn^{65} (Gaither y Eide, 2000). Por otro lado, la depleción del Zn en células mononucleares resultó en un incremento de la expresión de Zip2 (Cao et al., 2001). De acuerdo al trabajo de Cousins et al. (2003), Zip2 fue un gen humano que respondió con un mayor incremento a la depleción de Zn y fue regulado en baja con la suplementación con Zn. Sin embargo, las diferencias con los animales parecen ser grandes. Por ejemplo, el genotipo $Zip2^{-/-}$ no demostró signos de deficiencia de Zn, pero parece ser más sensitivo a la deficiencia de Zn durante la preñez (Peters et al., 2007).

Zip3 (SLC39A3)

Este transportador responde de similar manera que los dos anteriores, pero la especificidad por el Zn parece menor. Se ha encontrado en médula ósea y bazo, y en menor cantidad en intestino delgado e hígado (Liuzzi y Cousins, 2004). La expresión de Zip3 es alta en células epiteliales mamarias y es inducible por la prolactina. Su función es la de un importador de Zn en estas células especializadas, que durante la lactación secretan una cantidad importante del mineral en leche (Kelleher y Lönnnerdal, 2005).

Zip4 (SLC39A4)

El hZip4 fue identificado como el gen responsable de la acrodermatitis enteropática humana, un síndrome de malabsorción de Zn (Wang et al., 2002a; Kasana et al., 2015). Un similar defecto hereditario relacionado con la absorción del Zn es citado en bovinos (Kroneman et al., 1975; Machen et al., 1996). La administración de Zn cura esta afección y la absorción de Zn en este caso ocurriría por otros transportadores de menor afinidad o por la ruta paracelular. Zip4 se expresa, en humanos, en intestino delgado y riñón, y en ratones en intestino delgado y saco vitelino, con pequeñas cantidades en estómago e hígado (Liuzzi y Cousins, 2004). El gen y la proteína Zip4 son dinámicamente regulados por múltiples mecanismos postranscripcionales en respuesta a la disponibilidad de Zn. Se ha demostrado que el transportador Zip4 se acumula en la membrana apical de los enterocitos de ratones deficientes en Zn debido a un incremento en la estabilidad del ARNm y en la estabilización de la proteína. Por el contrario, cuando la provisión de Zn se incrementa, el ARNm es desestabilizado y la proteína es internalizada y degradada rápidamente (Dufner-Beattie et al., 2003a; Kim et al., 2004; Andrews, 2008). Existen diferencias en la respuesta al “noqueo” del gen en relación a la supervivencia embrionaria. La pérdida completa de la función del Zip4 no es letal para el embrión en humanos, pero sí en ratón, lo cual sugiere la falta de un sistema de transporte alternativo para proveer Zn a través de la placenta (Lichten y Cousins, 2009).

Tomados conjuntamente, la regulación positiva de Zip4 en los enterocitos y la regulación negativa de ZnT1 y ZnT2 en células acinares pancreáticas cuando se suministra una dieta baja en Zn son factores claves que balancean la absorción intestinal con las pérdidas endógenas vía secreciones pancreáticas (homeostasis).

Zip5 (SLC39A5)

Zip5 es expresado en varios tejidos, como intestino delgado (superficie basolateral de los enterocitos), páncreas (células acinares) y saco vitelino, pero a diferencia de Zip4 la expresión del gen Zip5 no es inducida en la deficiencia de Zn, y la proteína Zip5 es removida de la superficie celular e internalizada en esta situación. Probablemente tenga un rol antagónico al Zip4, actuando en la remoción del Zn del cuerpo. Cuando la dieta aporta cantidades adecuadas de Zn el Zip5 puede funcionar removiendo el Zn desde la sangre vía páncreas e intestino, los sitios mayores de excreción de Zn en mamíferos, mientras que la adquisición de Zn intestinal vía Zip4 es mínima. En contraste, durante los períodos de deficiencia de Zn, cuando la secreción de Zn por el páncreas y el intestino es minimizada, el Zip5 es removido de la superficie celular, y la captación intestinal de Zn se ve aumentada por inducción del Zip4 (Dufner-Beattie et al., 2004; Geisser et al., 2013).

Zip6 (SLC39A6)

El Zip6, también llamado HLIV-1, es expresado abundantemente en la membrana plasmática de tejidos sensibles a las hormonas esteroideas, tales como placenta, glándula mamaria y próstata (Taylor y Nicholson, 2003). Es de enorme interés en humanos ya que su expresión es estimulada por estrógenos en células de cáncer de mama (Manning et al., 1998). El Zip6 está implicado en el influjo de Zn hacia la célula y puede actuar como una metaloproteínasa que degrada proteínas de la matriz extracelular, por lo que se lo relaciona con el desarrollo y la metástasis de tumores (Stamenkovic, 2003). Por otro lado, el Zip6 parece también estar relacionado con la homeostasis del Zn en células del sistema inmunitario (Lichten y Cousins, 2009) y en cerebro (Chowanadisai et al., 2005).

Zip7 (SLC39A7)

El transportador KE4 humano (hKE4) o Zip7 se encuentra en retículo endoplásmico de una amplia variedad de células: placenta, hígado, páncreas, glándula salival, riñón, hipotálamo y próstata. Su función es el transporte de Zn desde las organelas hacia el citoplasma. En el DTM V posee un motivo metaloproteínasa, al igual que otros transportadores de la subfamilia LZT (Taylor et al., 2004). Coincidentemente, otro trabajo más reciente cita al Zip7 como esencial para el transporte del Zn desde el aparato de Golgi hacia el citoplasma. Este transportador está regulado por el status de Zn, ya que su abundancia en las membranas de vesículas intracelulares disminuye con la suplementación del mineral (Huang et al., 2005).

Zip8 (SLC39A8)

El gen BIGM103 o Zip8 está altamente expresado en humanos: páncreas, pulmón, hígado y timo, y su localización es intracelular (endosomas y lisosomas). En monocitos, este gen es inducido por la pared de *Mycobacterium bovis*, lipopolisacáridos (LPS) y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) (Begum et al., 2002). La proteína Zip8 tiene actividad de transportador de Zn desde la organela hacia el citoplasma y de metaloproteasa. Su localización en endosomas puede estar asociada con la eliminación mediada por fagocitosis de componentes microbianos en macrófagos (Begum et al., 2004). Aydemir et al. (2006) hallaron que Zip8 es aún más abundante en linfocitos T, pero no se verificó respuesta ante una suplementación moderada de Zn en humanos adultos. Por otro lado, un trabajo reciente (He et al., 2006) demostró, en una línea celular de fibroblastos fetales de ratón, que Zip8 interviene en la captación celular de manganeso (Mn) y de cadmio (Cd). En células de riñón canino, Zip8 se localiza en la membrana apical y también actuaría en la captación y disposición de Mn y Cd.

Zip9 (SLC39A9)

Este transportador ha sido identificado a nivel subcelular, mediando el transporte de Zn desde las organelas hacia el citoplasma, pero su importancia en la homeostasis celular del Zn parece ser menor a la de otros transportadores (Matsuura et al., 2009).

Zip10 (SLC39A10)

El Zip10 es un transportador ubicado específicamente en la membrana plasmática de los hepatocitos y se considera como el responsable del ingreso de Zn en este tipo de células (Lichten y Cousins, 2009).

Zip11 (SLC39A11)

El Zip11 colabora en la homeostasis tisular del Zn, y ha sido aislado en la mucosa de estómago, ciego y colon (Martin et al., 2013).

Zip12 (SLC39A12)

Este transportador puede estar relacionado con el transporte de Zn en cerebro (Bly, 2006).

Zip13 (SLC39A13)

El Zip13 es un transportador que se encuentra en el Aparato de Golgi y permite el eflujo del Zn hacia el citoplasma. Su delección en ratones o su mutación en humanos se han identificado

con defectos graves en el desarrollo del tejido conectivo y el hueso (Fukada et al., 2008; Giunta et al., 2008).

Zip14 (SLC39A14)

Desde hace cierto tiempo, era conocido que las respuestas sistémicas frente a la infección y la inflamación incluyen la captación hepática de Zn, lo que produce una hipozinqueia transitoria, pero las proteínas transportadoras implicadas en estos procesos no habían sido investigadas. El Zip14 fue el transportador de Zn que mayor respuesta mostró frente a la inflamación, interleukina (IL) 6 y LPS en los hepatocitos de ratón. Estos elementos elevaron la cantidad de ARNm de Zip14 y la cantidad de Zip14 en la membrana plasmática de los hepatocitos y la respuesta fue específica para este órgano (Liuzzi et al., 2005). El Zip14 puede mediar la captación hepática de otros cationes, como el Fe no ligado a la transferrina, el que aumenta en casos de hemocromatosis y de sobrecarga de Fe (Liuzzi et al., 2006). De acuerdo a Tominaga et al. (2005), el transportador Zip14 es esencial en el proceso de adipogénesis. También se han encontrado variantes de este transportador en otros tejidos, como intestino, riñón y testículo, aunque no está clara su significancia funcional (Lichten y Cousins, 2009).

Absorción

En monogástricos, la absorción del Zn tiene lugar principalmente en el intestino delgado (McDowell, 1992). Lee et al. (1989) hallaron que la mayoría de la absorción de Zn a partir de una dosis oral en humanos ocurre en la parte proximal del intestino delgado, pero este fenómeno es probablemente una función del mayor nivel del Zn presentado a las células epiteliales en esta región. La capacidad de absorción de Zn del colon de rata es al menos tan alta como la de regiones más proximales (Seal y Mathers, 1989; Gisbert-González y Torres-Molina, 1996; Condomina et al., 2002). En rumiantes, se admite que el intestino delgado es también el principal sitio de absorción (Miller y Cragle, 1965). Aunque se postuló la posibilidad de la absorción del Zn en el rumen (Arora et al., 1969), trabajos modernos demostraron que si bien el Zn es tomado por los epitelios ruminal y omasal, no parece existir un pasaje más allá de la serosa (Wright et al., 2008).

Los estudios funcionales sobre el transporte y la captación intestinal de Zn han usado distintas preparaciones: sacos evertidos de intestino de rata (Seal y Mathers, 1989), intestino de rata aislado y vascularmente perfundido (Smith y Cousins, 1980; Hoadley et al., 1987) y vesículas de membrana de borde en cepillo de intestino delgado de rata (Menard y Cousins, 1983) y de cerdo (Blakeborough y Salter, 1987; Tacnet et al., 1990).

La alta capacidad de la albúmina plasmática para ligar Zn lleva a que la mayoría del Zn plasmático esté unido a proteínas (Ford, 2004). Similarmente, es probable que el Zn libre en el lumen intestinal, en presencia de una digesta compleja, represente una pequeña proporción del Zn total. La concentración de Zn total intracelular es alta, y ha sido estimada en alrededor de 200 μM o 13 $\mu\text{g/ml}$ (Palmiter y Findley, 1995). Sin embargo, la presencia de proteínas limita dramáticamente la concentración de Zn libre, la que fue estimada por Outten y O'Halloran (2001) en un rango femtomolar, correspondiente a menos de un átomo de Zn libre por célula.

El proceso de absorción puede ser dividido en dos eventos separados: primero, la captación del Zn desde el lumen intestinal hacia el interior del enterocito, y, segundo, el transporte desde la célula hacia la sangre (Krebs, 2000). Varios investigadores hallaron que el transporte

de Zn tiene un componente saturable y otro no saturable (Menard y Cousins, 1983; Hoadley et al., 1987; Blakeborough y Salter, 1987; Tacnet et al., 1990; Fleet et al., 1993). Los procesos saturables ocurren a través de un mecanismo de difusión facilitada (mediado por transportadores), que puede ser secundariamente activo (Cousins et al., 2006). Cuando se incluyó ouabaína en el medio de incubación de los sacos evertidos de intestino (Seal y Mathers, 1989), las tasas de transferencia de Zn (proceso saturable) se redujeron un 28 %, en el promedio de las dietas usadas y de sitios del tracto gastrointestinal. La reducción fue mayor en duodeno (33 %) y en colon (38 %) que en íleon (1 %). El efecto de la ouabaína indica que, al menos en algunos sectores del intestino, existen pasos en la absorción de Zn que son dependientes de la ATPasa Na-K. Una pequeña porción de la captación y el transporte puede ser no saturable, a través de una difusión simple (Steel y Cousins, 1985) y un movimiento paracelular (Bronner, 1987).

La captación saturable puede involucrar la unión con ligandos de bajo peso molecular, que están presentes en el lumen intestinal. El complejo Zn-ligando dona el Zn a un transportador de membrana y, subsecuentemente, el transportador libera el Zn hacia el interior de la célula (Swinkels et al., 1994). Como se señalara anteriormente, el Zip4 es el principal transportador localizado en la membrana apical de los enterocitos implicado en la absorción de Zn, y sus niveles aumentan en la deficiencia de Zn.

Existen algunos transportadores, como el ZnT2, encargados de internalizar el Zn en las vesículas de los enterocitos y de regular el nivel de Zn intracelular, pero su importancia aumenta cuando se proveen niveles dietarios elevados del mineral. Yu et al. (2006) han confirmado por inmunohistoquímica la localización intracelular, ya sea en vesículas o en la región perinuclear, de ZnT4, ZnT5, ZnT6 y ZnT7, aunque la abundancia en distintos sitios del tubo digestivo es variable.

El proceso a través del cual el Zn es transportado a través de la célula hasta la membrana basolateral, para su posterior liberación no se conoce en profundidad (Ford, 2004; Wang y Zhou, 2010). Dentro del enterocito, el transporte de Zn estaría a cargo de una proteína intestinal rica en cisteína (PIRC), la que incrementa la absorción del Zn, transportándolo desde la chapa estriada (extremo apical) hasta la membrana basolateral. La PIRC se une en una gran proporción al Zn que entra en la mucosa intestinal, a bajas concentraciones de Zn dietario, y esta unión es saturable a niveles mayores. Sin embargo, su síntesis no es inducible por el Zn ni por otros metales. De modo que falta elucidar algunos aspectos del papel de la PIRC en la absorción del Zn. La MT intestinal compite por el Zn con esta proteína, de manera que contribuiría a regular la absorción de Zn (Hempe y Cousins, 1992; Levenson et al., 1994). De todas maneras, este modelo PIRC/MT fue puesto en dudas, ya que Fleet et al. (1993) hallaron evidencias conflictivas trabajando en células Caco-2, y los trabajos modernos lo han dejado de lado. Por lo tanto, no se considera en la Figura I.2. Asimismo, la presencia de Zn chaperonas ha sido postulada, pero no demostrada fehacientemente, como sucedió claramente con las Cu chaperonas (Hill y Link, 2009).

El pasaje desde el enterocito a la corriente sanguínea, a través de la membrana basolateral, es un proceso mediado por ZnT1, aunque sus niveles no aumentan en la deficiencia de Zn. El pasaje serosa-mucosa, importante en la excreción del mineral, está a cargo del transportador Zip5.

El ensayo de Jou et al. (2009), en el que se trabajó con cuatro niveles dietarios de Zn en ratas, confirma la importancia de Zip4 y ZnT1 en el proceso de absorción intestinal de Zn. Además, el ZnT5 aparece en membrana apical de enterocitos en jejunio como encargado del

eflujo de Zn hacia el lumen intestinal y el ZnT7 parece mediar la secuestración del Zn en vesículas intracelulares y el tráfico transcelular del mismo en el enterocito (Cousins, 2010).

La eficiencia máxima de absorción de Zn en intestino delgado se alcanza temprano en la vida, a juzgar por el trabajo de Hambidge et al. (2006), quienes hallaron que la absorción de Zn es similar en niños de 4 meses que en adultos, cuando es ajustada por el largo del intestino.

Además de los transportadores de Zn propuestos, la MT es otra proteína que interviene en el metabolismo del Zn, así como de otros microminerales. La MT es una proteína de bajo peso molecular, alrededor de 6.500 daltons, formada por una simple cadena de 61 aminoácidos y que tiene capacidad para ligar 5 a 7 átomos de metal por molécula (gracias a su alta cantidad de cisteínas, alrededor de un 25-30 % de sus aminoácidos). Se une preferentemente a Cd, mercurio (Hg), Cu y Zn. Debido a que la MT intestinal es sintetizada en proporción al Zn dietario, se ha propuesto un rol de la misma en la regulación de la absorción del Zn (Cousins, 1985; Cousins y Lee-Ambrose, 1992). La MT reduce la absorción de Zn, secuestrándolo dentro del enterocito, debido a su mayor afinidad por este mineral con respecto a otras proteínas intestinales.

Sin embargo, el rol de la MT en la absorción del Zn ha sido criticado por algunos investigadores. Flanagan et al. (1983) encontraron sólo efectos transitorios del nivel de Zn dietario sobre la síntesis de MT intestinal. Similares conclusiones se obtienen a partir del trabajo de Reeves (1995), en el que, si bien la concentración de MT en intestino (y en otros órganos) aumentó inicialmente, descendió luego a niveles cercanos a los del grupo control, a pesar de que la concentración dietaria del Zn era siete veces mayor en el grupo tratamiento. Este autor propone que durante una exposición de largo término se ponen en juego otros mecanismos regulatorios de la absorción de Zn. Adicionalmente, Coopen y Davies (1987) encontraron que el Zn dietario sólo induce la síntesis de MT intestinal en ratas a niveles de 5 a 80 ppm. A niveles mayores a 80 a 160 ppm, no hallaron una posterior inducción de la síntesis de MT.

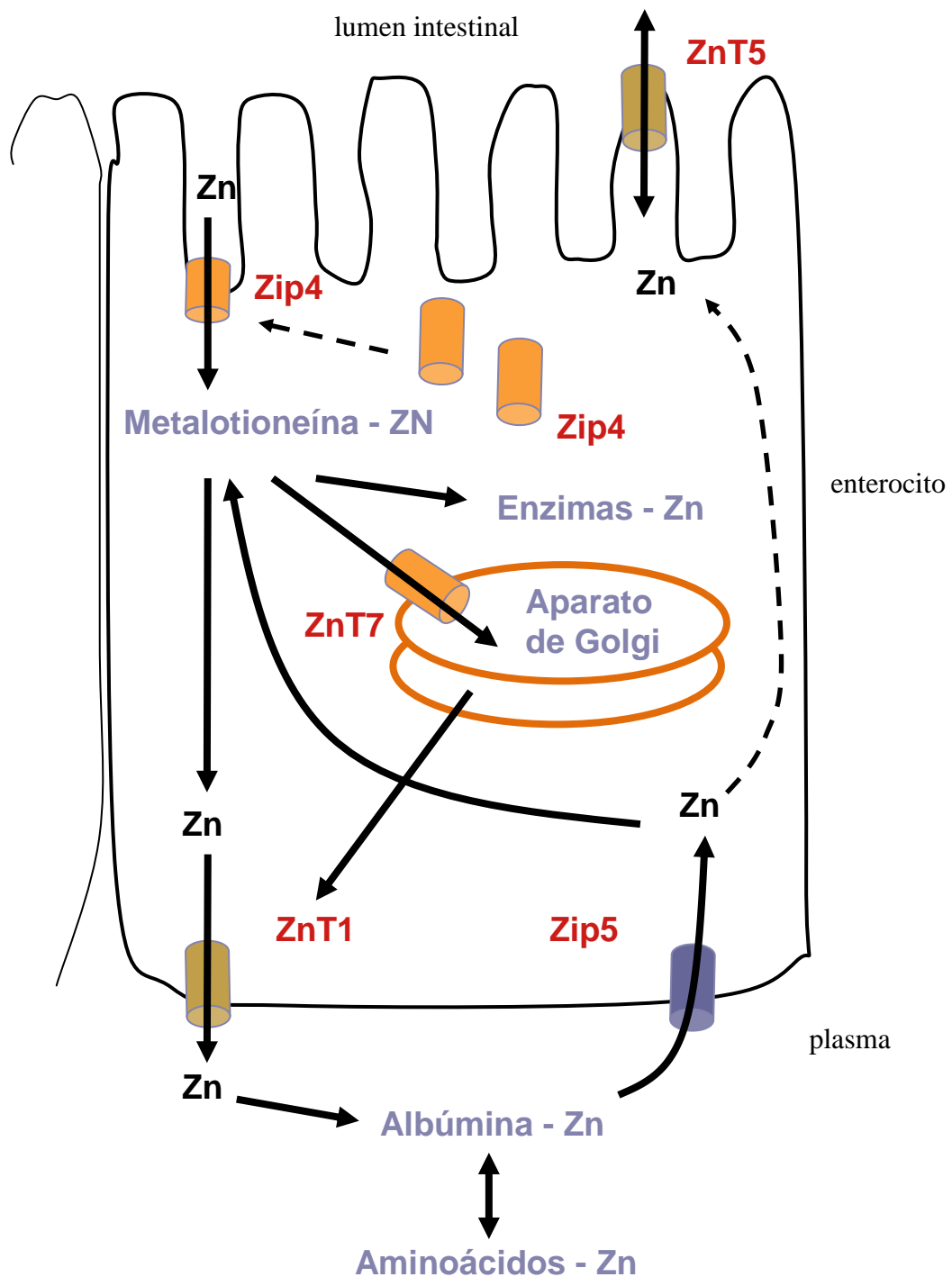
Durante varios años, la hipótesis dominante acerca del mecanismo por el cual altos niveles de Zn disminuyen la absorción de Cu, se refirió a que el Cu se liga fuertemente a la MT inducida por el Zn, se torna no disponible para su transporte a través de la membrana basolateral de los enterocitos hacia la circulación, y finalmente el Cu unido a la MT se pierde a medida que progresa la descamación de las células epiteliales intestinales (Cousins, 1985). Sin embargo, Reeves et al. (1993) hallaron en ratas que 560 ppm de Zn disminuyeron la concentración de Cu en suero e hígado, pero el efecto sobre la absorción no estuvo asociado a un incremento del Cu inmovilizado en los enterocitos sino a una interferencia en el transporte de Cu hacia el interior de las células epiteliales. Estudios posteriores (Reeves y Rossow, 1996) confirmaron que el efecto de altos niveles de Zn y Cd sobre el status de Cu no es el resultado de la unión de la MT con el Cu en el intestino, y que en ratones incapaces de sintetizar MT (Reeves, 1998) la interacción Zn-Cu se produce de igual manera.

Existen también diferencias de especie con respecto a la MT. Flanagan et al. (1983) encontraron, en ratas, una relación inversa entre niveles de MT en intestino y absorción de Zn, pero ninguna correlación en el ratón. Saylor et al. (1980) informaron que el contenido de MT del intestino de los ovinos no es influenciado por el Cu ni por el Zn. Estos autores proponen que la reducida capacidad de esta especie para sintetizar MT puede ser la causa su marcada susceptibilidad a la intoxicación con Cu.

En pollos se ha propuesto que la vitamina A podría intervenir en la regulación de la absorción intestinal, estimulando la síntesis de los transportadores de Zn (Berzin y Bauman,

1987). En relación con ello, se ha demostrado que la deficiencia de vitamina A en ratas disminuye la concentración de Zn en algunos tejidos, como hígado y testículos (Rahman et al., 1995). La adición de 1,25 dihidroxi vitamina D₃ puede beneficiar la absorción de Zn en cultivos celulares de células intestinales (Fleet et al., 1993) y en intestino de pollos e, incluso mejorar la eficacia de las fitasas, pero no está claro cuál es el mecanismo (Roberson y Edwards, 1994). Hasta el momento, la relación causal entre deficiencias de vitaminas A y D y deficiencia de Zn es un área que no ha sido explorada convenientemente.

Figura I.2. Modelo de la absorción intestinal de Zn (adaptado de Cousins et al., 2006 y de Lichten y Cousins, 2009; ver indicaciones en el texto).



Factores de afectan la absorción del zinc

Varios factores pueden afectar la absorción del Zn, y, por lo tanto, su biodisponibilidad. Estos factores han sido estudiados ampliamente en el hombre y animales monogástricos. Entre otros, se citan: fitatos (O'Dell et al., 1964), calcio (Ca), generalmente potenciando la acción de los fitatos (Zhou y Erdman, 1995), Cd (Doyle et al., 1974; Brzóška y Moniuszko-Jakoniuk, 2001), Cu (Van Campen, 1969), hierro (Fe) (Kreuzer y Kirchgessner, 1994), fibra (Kelsay et al., 1979) y baja proteína dietaria (Van Campen y House, 1974).

El **ácido fítico** o mioinositol hexafosfato existe naturalmente en las semillas de cereales y oleaginosas, los ingredientes más frecuentemente usados en las dietas de cerdos y aves, y representa hasta el 70 % del fósforo (P) total. La hidrólisis del fitato en el tracto digestivo puede ocurrir por acción de tres tipos de fitasas: dietarias, bacterianas y de la mucosa intestinal. La acción de las fitasas dietarias puede tener importancia en monogástricos en algunas ocasiones, ya que el grano de trigo tiene mayores niveles que el de maíz (NRC, 2012). Las fitasas microbianas degradan el fitato en rumiantes, tornando disponible el P y minimizando el efecto antagónico sobre el Zn (Yanke et al., 1998). Las fitasas intestinales se hallaron en algunas especies, como el hámster, pero su rol sería poco importante (Williams y Taylor, 1985). El ácido fítico tiene una fuerte capacidad quelante de cationes di y trivalentes de importancia nutricional, como Zn, Cu, Fe y Ca. Estos complejos son solubles a pH ácido, pero la solubilidad es muy baja en el pH neutro del intestino (Zhou y Erdman, 1995). Hace varias décadas que se conoce el efecto antagónico de los fitatos sobre el Zn (O'Dell y Savage, 1960). En humanos también se identificó al ácido fítico como el factor inhibitorio primario en las dietas a base de proteína de soja (Lönnerdal et al., 1988; Zhou et al., 1992). Estudios in vivo con ratas (Lönnerdal et al., 1989) y humanos (Sandstrom y Sandberg, 1992), e in vitro (Simpson y Wise, 1990) han demostrado que sólo los inositol fitatos con alto grado de fosforilación (penta y hexafosfatos) inhiben la absorción del Zn.

La adición de fitasas de origen microbiano mejora la utilización del Zn en pollos. Alrededor de 0,9 mg de Zn fueron liberados por cada 100 U de fitasa, en un rango de 150 a 600 U de fitasa/kg de alimento (Yi et al., 1996). Otro trabajo en pollos (Mohanna y Nys, 1999) halló que la adición de 800 U de fitasa equivale a la incorporación de 14 mg de Zn/kg de ración a base de maíz y pellet de soja, por su efecto de incremento en la disponibilidad del Zn dietario. De acuerdo con Revy et al. (2004), la adición de 1.200 U de fitasa/kg de ración en lechones destetados excede los efectos de la adición de 20 ppm de Zn (a partir de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), cuando se consideraron las concentraciones plasmática y ósea de Zn, la retención de Zn y los niveles de FA plasmática.

En un trabajo reciente realizado en humanos, Fredlund et al. (2006) hallaron que la absorción de Zn disminuyó paulatinamente del 22 % al 6 % cuando se adicionaron cantidades crecientes de fitatos al alimento, y que el agregado de solamente 50 mg de ácido fítico por comida resultó en efectos estadísticamente significativos.

El efecto inhibitorio de los fitatos no existe en animales con rumen funcional, y sólo puede tener importancia práctica cuando se usan sustitutos lácteos en terneros, en los que parte de la proteína es aportada por fuentes vegetales. En un ensayo con dietas semisintéticas bajas en Zn, la adición de fitatos no agravó los signos clínicos de la deficiencia de Zn en corderos (Ott et al., 1964).

Efectos del Ca sobre la absorción del Zn

Desde la década de 1950 se reconoce la importancia del Ca como antagonista del Zn en las dietas comunes de cerdos, a base de grano de maíz y pellet de soja. Cuando se aumentó el contenido de Ca en las raciones de lechones destetados de 0,65 % a 1,25 % se presentó un pobre crecimiento y una alta incidencia de paraqueratosis, lo que se solucionó con la adición de 50 ppm de Zn como carbonato de Zn (Luecke et al., 1957). Similares resultados obtuvieron Lewis et al. (1957) cuando incrementaron el contenido de Ca de 0,5 % a 0,8 % ó 1,2 %.

Oberleas et al. (1962) compararon el desempeño de cerdos alimentados con raciones a base de glucosa, con dos fuentes de proteína: caseína y harina de soja, con o sin adición de ácido fítico y de Ca. Este ensayo demostró que el ácido fítico es la sustancia vegetal que interfiere con la absorción de Zn y que el Ca a niveles elevados ejerce un efecto mayor con dietas altas en fitatos. En concordancia con estos resultados, en estudios con ratas en los que se utilizó proteína de soja, la relación molar (fitatos x Ca)/Zn predijo mejor la biodisponibilidad del Zn que la simple relación fitato/Zn (Fordyce et al., 1987).

Aún con dietas occidentales, relativamente bajas en fitatos, la interacción Ca x fitatos x Zn parece relevante en humanos. La suplementación con 468 ó 600 mg de Ca en una dosis (Wood y Zheng, 1997; Argiratos y Samman, 1993) disminuyó la absorción y el balance de Zn. La forma en que se proveyó el Ca no influyó en su efecto antagónico. La absorción aparente de Zn fue de 13,07 % en la dieta base y de 2,26 % y 0,98 % en las dietas suplementados con Ca como fosfato de Ca o leche, respectivamente (Wood y Zheng, 1997).

Haaranen (1963) señaló que altos consumos de Ca pueden incrementar los requerimientos de Zn en vacas lecheras. Sin embargo, cuando se observa el conjunto de datos que sustenta su ecuación de regresión, claramente se advierte que no pueden extraerse conclusiones estadísticas valederas. El aumento del nivel de Ca de 0,25 a 0,50 % en raciones de terminación de novillos (Perry et al., 1968) disminuyó ligeramente los niveles de Zn sérico, pero en ambos grupos estuvieron dentro de los límites normales (2,14 vs 1,88 µg/ml). Los niveles de Zn sérico fueron similares luego de la dosificación oral con Zn en vacas lecheras que consumían dietas con 0,8 ó 1,5 % de Ca (Kincaid, 1979). En otros trabajos en rumiantes, los efectos de altas concentraciones de Ca dietario fueron estadísticamente significativos, pero de pequeña magnitud (Fontenot et al., 1964; Mills y Dalgarno, 1967).

En ovinos los resultados son similares. La elevación del Ca de 0,5 a 0,8 % en las dietas de corderos (Pond, 1983) que contenían niveles de 19 a 26 ppm de Zn no perjudicó la ganancia de peso ni la conversión alimenticia, ni los parámetros sanguíneos, como Zn y FA plasmáticos. Similares niveles de Ca tampoco demostraron ser perjudiciales sobre el desempeño reproductivo de ovejas gestantes y lactantes (Pond y Wallace, 1986). Mills et al. (1967) informan en su publicación que en un ensayo preliminar no pudieron producir la deficiencia de Zn en corderos alimentados con una dieta conteniendo 35 % de pellet de soja (un alimento alto en fitatos) y 1,6 % de Ca (como carbonato de Ca). A la luz de estos resultados, y coincidiendo con Mills (1978), resulta improbable que el Ca pueda tener importancia en rumiantes como antagonista del Zn en rumiantes.

Efecto del Fe sobre la absorción del Zn

El Fe antagoniza la absorción del Zn en el intestino de ratas, de acuerdo a lo que se desprende del trabajo de Wien et al. (1994), con vesículas de membrana de borde en cepillo. Cantidades equimolares de Fe redujeron la absorción de Zn entre 13 y 22 %. Yamaji et al. (2001) hallaron que el Fe inhibe la absorción de Zn en células intestinales humanas Caco2, pero no lo inverso. También se estudió el antagonismo de estos minerales en segmentos de

jejuno de ratas (Peres et al., 2001). El Fe disminuyó la captación y la absorción neta de Zn de una manera dosis dependiente entre relaciones 2:1 y 5:1, y a partir de allí se alcanzó una meseta. Esta competición se observa a pesar de que los mecanismos de absorción de ambos minerales son diferentes (Kordas y Stoltzfus, 2004). El pasaje del Fe por la membrana apical de los enterocitos es mediado por el DMT1 (divalent metal transporter-1) y el transporte a través de la membrana basolateral por IREG1 (iron regulated transporter 1) o ferroportina.

Las investigaciones sobre la interacción Fe-Zn son importantes, ya que la suplementación con Fe, en forma de píldoras o de alimentos fortificados, es una práctica común en mujeres embarazadas y niños en países de todo el mundo (Fairweather-Tait, 1995). Cuando el Fe suplementario se provee en solución en cantidades de 25 mg por dosis, disminuye la absorción de Zn, aún cuando la relación Fe:Zn sea de 1:1 (Salomons y Jacob, 1981).

Si grandes cantidades de suplementos de Fe son ingeridos en ausencia de alimento, es probable que el Fe pueda igualmente disminuir la absorción de Zn. En un estudio realizado con mujeres embarazadas (O'Brien et al., 2000), la administración de una dosis de 60 mg de Fe en forma de píldora, disminuyó la absorción al 20,5 % (grupo Control: 47,0 %) y los niveles de Zn plasmático. Sin embargo, cuando los suplementos de Fe y Zn son dados en una comida, tal efecto no es observado, aún con relaciones Fe:Zn elevadas (Davidson et al., 1995; Whitaker, 1998). Según Walsh et al. (1994), bajo condiciones normales la absorción de Zn es determinada largamente por la naturaleza y la extensión de la formación de complejos con el alimento en el tracto intestinal, y, normalmente, la influencia del Fe sobre el Zn puede no ser significativa. Fischer Walker et al. (2005) sostienen que, hasta el momento, no hay razones para excluir los programas de suplementación conjunta de Fe y Zn en humanos, en poblaciones en riesgo de deficiencia.

En un ensayo con ratas (Dursun y Aydogan, 1995) trabajaron con una dieta Control con 100 ppm de Zn y 150 ppm de Fe, con la que obtuvieron una absorción verdadera de Zn del 78,9 %. Las dietas con niveles de Fe de 388 y 827 ppm, redujeron la absorción de Zn al 67,1 y 63,9 %, respectivamente. Kreuzer y Kirchgessner (1994) utilizaron niveles de 50 ppm de Zn en tres dietas, con diferentes niveles de Fe: deficiente (3,6 ppm), normal (40 ppm) y excesivo (400 ppm). La absorción aparente de Zn fue de 41 %, 34,5 % y 28,6 %. Sin embargo, las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas entre los valores extremos.

Niveles promedio de 1.700 ppm de Fe en dietas a base de silaje de maíz con niveles de Zn de 48 ppm, no lograron disminuir los valores de Zn plasmático durante un período experimental de 140 días en novillos (Mullis et al., 2003). Standish et al. (1969) hallaron que altos niveles de Fe en el alimento disminuyeron la concentración de Zn en algunos órganos en bovinos. La dieta basal de feedlot contenía 77 ppm de Fe, con un nivel adicional de 50 ppm de Zn. La suplementación con 400 ppm de Fe, en forma de sulfato ferroso no tuvo efectos negativos sobre el Zn, pero 1.600 ppm de Fe disminuyeron ligeramente la concentración de Zn en hígado (118 vs 98 ppm) y riñón (87 vs 81 ppm). La adición de 1.000 ppm de Fe, como sulfato ferroso) en la dieta de novillos (74 ppm de Zn y 100 ppm de Fe) disminuyó el nivel de Zn en hígado (145 vs 118 ppm), pero no en bazo y riñón. La absorción aparente de Zn fue numéricamente afectada (24,6 vs 12,2 %), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Standish et al., 1971).

McGuire et al. (1985) investigaron el efecto de dos fuentes diferentes de Fe en terneros Holstein. La suplementación con 1.000 ppm de Fe, como sulfato ferroso, disminuyó transitoriamente los niveles séricos de Zn. También disminuyó la concentración de Zn en

páncreas (89,4 vs 66,7 ppm) y bazo (84,5 vs 77,5 ppm), pero no en hígado. La adición de igual cantidad de Fe como carbonato de Fe no tuvo ningún efecto negativo sobre el Zn.

Los efectos del Fe en niveles elevados fueron investigados en corderos alimentados con una dieta a base de forrajes (38 ppm de Zn), y suplementada con 300, 600 y 1.200 ppm de Fe, como carbonato ferroso (Prabowo et al., 1988). No se detectaron diferencias en los niveles plasmáticos de Zn ni en distintos órganos, con respecto al grupo Control. En un trabajo realizado con corderos alimentados con una dieta de feedlot a base de maíz partido y pellet de soja (Standish y Ammerman, 1971), la adición de 1.600 ppm de Fe, como sulfato ferroso y citrato férrico, disminuyó la concentración de Zn en hígado y riñón, pero el efecto no fue estadísticamente significativo, posiblemente por el bajo número de repeticiones (n = 4).

Tomados en su conjunto, los ensayos realizados con rumiantes parecen indicar una interferencia del Fe en la absorción del Zn, a niveles elevados de Fe, los que, sin embargo, pueden encontrarse en forrajes verdes o conservados. Esta, posiblemente, sea de una de las pocas interacciones de relevancia práctica en rumiantes.

A pesar de la existencia de otros factores, se reconoce que, en nutrición práctica de monogástricos, los antagonistas más importantes son el fitato y el Ca. Debido a que todas las dietas para cerdos y aves los contienen, es de rutina la adición de núcleos minerales con Zn y de fitasas microbianas.

Efecto del S sobre la absorción del Zn

Recientemente, Pogge et al. (2014) demostraron que dietas con alto contenido en sulfatos pueden disminuir la retención de Zn y la concentración hepática de Zn. Se postula que la menor absorción de Zn es consecuencia de la formación de sulfuro de Zn (ZnS) en el rumen, luego de la reducción de los sulfatos producida por las bacterias ruminales, aunque la magnitud de esta interacción probablemente sea menor que con el Cu.

Por otro lado, se ha demostrado que algunos aminoácidos, como histidina, lisina, glicina y cisteína (Giroud y Prakash, 1977; Wapnir et al., 1983) y algunos agentes quelantes, como el ácido etilendiamino tretracético (EDTA; Forbes, 1961) y el ácido ascórbico (Cousins, 1985), incrementan la absorción de Zn en monogástricos, pero la importancia práctica de estos hallazgos es relativa.

Dinámica del Zn en el tracto gastrointestinal de los rumiantes

Menos atención, comparativamente, se ha prestado a los procesos que involucran al Zn en el rumen y el resto del tracto gastrointestinal de los rumiantes. Los trabajos que abordan este tópico pueden agruparse en dos tipos: aquellos que investigan la solubilización del mineral contenido en el alimento, su captación por los microorganismos ruminales y sus consecuencias sobre la absorción intestinal y aquellos que se focalizan en utilizar cantidades supranutricionales de Zn para controlar la fermentación ruminal, de manera que produzca algún beneficio productivo en determinadas situaciones de alimentación.

Emanuele y Staples (1990) estudiaron la liberación de Zn de seis especies forrajeras a lo largo del tiempo en el rumen. Los valores promedios fueron de 26 % para el Zn inmediatamente solubilizado y de 43 % para el Zn lentamente liberado. La asíntota de la curva se alcanzó cerca de las 24 hs de incubación. El incremento de los niveles de proteína en la dieta no parece afectar la cantidad del Zn soluble en el rumen, al contrario de lo que sucede con el Cu (Ivan y Veira, 1981). En este ensayo, realizado con dietas a base de silaje de maíz,

la proporción de Zn soluble en el rumen fue baja, y varió entre el 9,8 y el 12,9 %. Sin embargo, cuando se midió la solubilidad del Zn en la digesta abomasal, se hallaron valores de 86,9 a 94 %. Kabaija y Smith (1988a) hallaron que la liberación de Zn a partir de gramíneas y leguminosas tropicales era solamente del 30 %, a partir de trabajos *in situ* con bolsitas de dacrón que permanecieron en el rumen 48 hs. Sin embargo, cuando se estudió la liberación del Zn a partir de ZnO y de un complejo Zn-polisacárido se comprobó una rápida desaparición del Zn soluble del fluido ruminal, que era captado por los microorganismos libres, en una menor proporción, o bien era tomada por los microorganismos unidos a la fase particulada de la digesta, en una mayor proporción, aunque también una porción adicional podía unirse a las partículas de alimento no digeridas. Kabaija y Smith (1988) estudiaron el efecto de la adición de forraje (heno de *Panicum maximum*) a una dieta a base de concentrados sobre la solubilidad del Zn en distintos sectores del tracto gastro intestinal. Estos investigadores hallaron que la adición de fibra a la ración disminuyó la solubilidad del Zn en preestómagos, abomaso e intestino delgado, y que la digestibilidad aparente del Zn bajó del 21 % en dietas bajas en forraje al 11,5 % en dietas con un 88 % de heno. Ivan et al. (1983) compararon dietas a base de silaje de maíz y silaje de alfalfa oreado y encontraron que la cantidad de Zn soluble era mayor con el primer tipo de dietas, lo cual se correlacionaba con una mayor concentración del mineral en bacterias y protozoos, con una mayor proporción de Zn soluble en las digestas duodenal e ileal y con una mayor absorción aparente del Zn. La defaunación del rumen en ovinos no cambió la concentración de Zn soluble en el rumen ni la proporción de Zn soluble en la digesta duodenal (Ivan y Veira, 1982).

Con respecto a los trabajos realizados con el objeto de provocar una modificación favorable en los parámetros de fermentación ruminal, parece no haber un completo acuerdo en los niveles de Zn a utilizar. Froeschel et al. (1990) usaron 1.142 ppm de Zn adicional, a partir de sulfato de Zn, en la alimentación de novillos, y aunque la suplementación con Zn disminuyó la degradación de la proteína en el rumen y, por lo tanto, incrementó el escape de proteína dietaria hacia el abomaso, también disminuyó el pasaje de proteína microbiana, y el pasaje posruminal de aminoácidos totales como porcentaje de la cantidad de aminoácidos consumida. Bateman et al. (2004) usaron niveles menores (500 ppm de Zn en forma de sulfato de Zn) en vacas lecheras. La adición de Zn aumentó el porcentaje molar de propionato y estrechó la relación acetato/propionato y, aunque disminuyó la degradación ruminal de la lisina, el efecto no alcanzó a ser estadísticamente significativo. Arelovich et al. (2000), en un ensayo realizado con vaquillonas alimentadas a base de heno de gramíneas suplementado con urea, utilizaron dos niveles de Zn adicional, que equivalían a 250 y 470 ppm de Zn dietarios y que llevaron la concentración de Zn en líquido ruminal a 7 y 12 µg/ml. Los niveles menores retardaron la liberación de amonio a partir de la urea, aumentaron la proporción molar de propionato y disminuyeron la relación acetato/propionato. Sin embargo, la adición de 470 ppm de Zn, si bien produjo estos efectos, también tendió a disminuir la digestibilidad de la MS. En otro ensayo posterior, realizado con novillos (Arelovich et al., 2008) que consumían una dieta a base de heno de alfalfa, grano de cebada y pellet de girasol, la adición de 470 ppm de Zn (en forma de cloruro de Zn) no produjo ninguna modificación en la fermentación ruminal ni en la digestibilidad de la MS. Eryavuz y Dehority (2009), en un ensayo *in vitro* hallaron que la adición de Zn, a razón de 50 µg/ml, lo que equivale a un consumo de una dieta con 2.000 ppm de Zn, produjo una reducción de la digestión de la celulosa a las 24 hs, pero no a las 48 hs de de cultivo. Los autores postulan que el Zn, a estas concentraciones, puede

afectar la tasa de degradación de la celulosa y que ese efecto puede deberse más a la inhibición de las enzimas celulolíticas que a la inhibición del crecimiento de estas bacterias.

Transporte

Después de su pasaje hacia la circulación portal, el Zn plasmático está distribuido en dos fracciones mayores. Cerca de $2/3$ se encuentran laxamente unidos a la albúmina y, probablemente, ésta sea la principal encargada de la transferencia del Zn de la sangre a los tejidos. La mayor parte del $1/3$ restante está unido firmemente a la alfa-2 macroglobulina, y una porción menor a ciertos aminoácidos, generalmente histidina y cisteína (Giroux et al., 1976; Parry, 1977; Cousins, 1985). La unión más fuerte del Zn con la alfa-2 macroglobulina sugiere que su habilidad para donar Zn a los tejidos en condiciones fisiológicas puede ser limitada, al menos que esté involucrado un proceso de endocitosis. Se ha propuesto que el Zn ligado a los aminoácidos está en equilibrio con el Zn ligado a la albúmina, y que tiene una importante función en el transporte y excreción del mineral. En realidad, sólo un 10-20 % del Zn de la sangre se encuentra en el plasma. La mayor parte está localizada en los eritrocitos y leucocitos (Cousins, 1985).

Captación tisular y almacenamiento

Cerca del 30 al 40 % del Zn que entra en el sistema portal es extraído por el hígado, para luego ser subsecuentemente liberado a la sangre (Hambidge et al., 1986). Las fluctuaciones de Zn dietario causan pequeños cambios en la concentración hepática del metal. La concentración intracelular del Zn es mantenida gracias a la acción concertada de varias hormonas. Aunque se han realizado pocos estudios sobre la captación hepática de Zn, se piensa que es un proceso que requiere energía y que consta de dos etapas. La primera, una fase de captación rápida, mediada por un transportador, y que representa la unión inicial a sitios específicos de la membrana plasmática. La segunda es una fase de acumulación a una tasa mucho más lenta. En el hepatocito, el Zn se encuentra a nivel de distintas fracciones subcelulares, principalmente a nivel del núcleo (nucleoproteínas) y del citosol (metaloenzimas y MT). La administración oral o parenteral de Zn se asocia a una inducción del gen de la MT hepática, y a una acumulación de Zn en hígado unido a esta proteína. Se ha estimado en ensayos *in vitro*, en situaciones que emulan un consumo normal de Zn, que ocurre un recambio casi total del Zn en el hepatocito en el término de 30 horas. No se conocen con exactitud los ligandos plasmáticos a los que es transferido el Zn luego de su eflujo del hígado, pero probablemente son la albúmina y algunos aminoácidos (Cousins, 1985). La captación de Zn por tejidos extrahepáticos está mediada por transportadores y por la MT.

La MT es el nombre genérico de una ubicua superfamilia de proteínas de bajo peso molecular, como se citara anteriormente, que poseen una estructura única, con una cantidad elevada de grupos sulfuros y de minerales, ambos en relación aproximada del 10 % (peso/peso) (Vasák, 2005). Contiene 20 cisteínas y puede ligar 7 átomos de Zn por molécula, formando grupos Zn-tiolato (Maret, 2003). La MT es sintetizada en varios órganos además del intestino, incluyendo hígado, riñón, páncreas, piel, etc., tanto en monogástricos (Cousins, 1985) como en rumiantes (Whanger et al., 1981). La función de la MT no está exactamente

definida, pero han sido demostrados varios roles. Puede funcionar como un amortiguador ante niveles excesivos o tóxicos de algunos metales (Hg, Cd, Zn y Cu) y como un donante de Zn para las metaloenzimas, y aún para las membranas biológicas. La afinidad relativa de la MT cargada con cantidades crecientes de Zn y las enzimas Zn dependientes posibilita la transfencia del mineral a las apoproteínas. Por ej., la molécula de anhidrasa carbónica compite eficientemente sólo con MT-5Zn a MT-7Zn (Pinter y Stillman, 2014). La MT también está involucrada en los mecanismos de defensa del organismo, por su rol en la protección frente a las especies reactivas del oxígeno, la adaptación al estrés y su rol antiapoptótico. En mamíferos existen cuatro isoformas, con pequeñas diferencias en su composición aminoacídica, codificadas por genes diferentes, de las cuales las principales son MT1 y MT2, halladas en casi todos los órganos. La MT3 es expresada solamente en el cerebro y la MT4 es más abundante en ciertos epitelios estratificados. En el hígado, se demostró que es sintetizada en los poli-ribosomas, lo que sugiere que no es una proteína secretada, sino que su rol biológico está relacionado con procesos intracelulares (Cousins, 1985; Vasák, 2005).

El papel detoxificante de la MT queda de manifiesto cuando se administran altos niveles de Zn en la dieta. Whanger et al. (1981), trabajando con bovinos y ovinos, demostraron que el Zn, en estos casos se une principalmente a la MT que se encuentra en intestino, hígado, páncreas y riñón. Lee et al. (1994) hallaron en ovejas que dosis altas de óxido de zinc (12 g de ZnO por animal, semanal o quincenalmente) durante un período de 18 meses provocaba un aumento de las isoformas de MT1a y 2 en riñón e hígado, pero no en intestino, aunque los coeficientes de variación fueron grandes y el número de animales por tratamiento (7) relativamente pequeño.

A partir de trabajos realizados en ratones (Dalton et al., 1996) se reconoce que la MT puede servir como un pool de Zn biológicamente disponible para períodos de deficiencia del mineral, siempre que la deficiencia no sea de larga duración. Altos niveles de ARNm de MT fueron encontrados en fibroblastos cultivados bajo condiciones de extrema deprivación de Zn. Estos resultados llevaron a la propuesta de que la MT, por un lado, protege a las células frente a los altos niveles de Zn, llevando a la formación de Zn₇-MT, y, por otro lado, ofrece una fuerza directriz para la captación de Zn mediante la producción transitoria de apoMT (Suhy et al., 1999).

La síntesis de MT1 y MT2 en el hígado está bajo regulación hormonal, y es estimulada por los glucocorticoides, el glucagon, la adrenalina y la IL1, hormonas que llevan a una acumulación hepática de Zn y a una disminución del Zn plasmático. El estrés de distintos orígenes, por calor, trauma físico, ejercicio excesivo, infección aguda o endotoxemia tiene un efecto marcado sobre el metabolismo del Zn, a través de una inducción de la síntesis de MT por medio de los mecanismos hormonales citados (Cousins, 1985). En vacas lecheras no se ha podido hallar una correlación negativa entre glucocorticoides plasmáticos (en respuesta a una inyección de corticotrofina) y Zn plasmático, pero cuando las vacas se evaluaron en estrés térmico se encontró una disminución del Zn en plasma y una correlación alta y negativa entre corticoides y Zn en sangre (Wegner et al., 1973).

Los grupos Zn-tiolato tienen una alta selectividad en su unión con iones metálicos y, a pesar de su alta estabilidad termodinámica, proveen un ambiente de coordinación reactiva para inducir labilidad cinética en reacciones de intercambio de metales. La actividad redox de estos grupos permite que el Zn se movilice acoplado su ambiente de coordinación a cambios en el estado redox, lo que es un nuevo principio funcional para una Zn-proteína y para las MT en

general. Así, los oxidantes liberan Zn, mientras que los reductores o antioxidantes restauran el potencial de los ligandos S para ligar Zn. Esto sugiere que existen interacciones entre el selenio (Se) y el Zn. La enzima glutatión peroxidasa (GPX) cataliza el acople de los pares redox glutatión reducido/glutatión oxidado y MT/tioneína (T), controlando la liberación y la unión con el Zn (Maret, 2003).

Otro avance significativo en la determinación de las funciones de la MT fue el descubrimiento de que la apoproteína (T) está presente en cantidades importantes, y que la relación MT/T y la cantidad MT+T varían en los diferentes tejidos (Yang et al., 2001). La presencia simultánea de la holo y la apoproteína es un hallazgo inusual para una metaloproteína y subraya la función dinámica del Zn en esta proteína. Debido a que los 20 grupos tiol de las cisteínas constituyen una capacidad quelante y reductora, la presencia de T tiene efectos tanto sobre el status de Zn como sobre el status redox de la célula (Maret, 2003). Su capacidad reductora, entonces, señala las funciones antioxidantes de la MT (Sato y Bremner, 1993).

Actualmente, se considera que los status celulares de Zn y de oxidación-reducción convergen en el par MT/T. La MT transduce señales oxidativas en señales de Zn vía la liberación de Zn, mientras que la T transduce señales de Zn en señales reductoras vía la inducción de la T por el Zn (Maret, 2003).

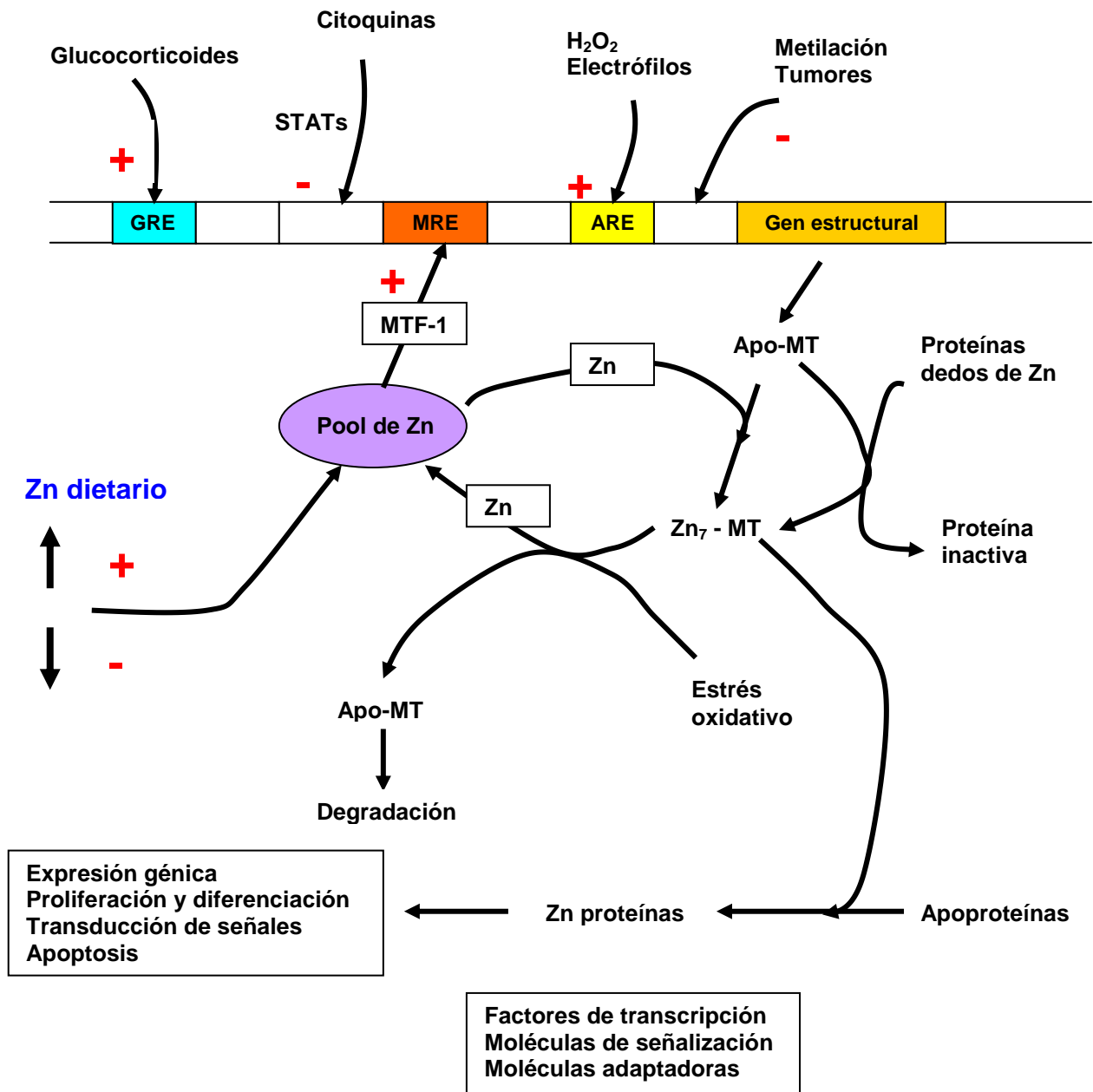
En la Figura I.3 se resume la regulación del gen de la MT y la función de la misma (Davis y Cousins, 2000). El promotor de la MT tiene varios elementos de respuesta que regulan positivamente la transcripción: 1) elementos de respuesta a metales (MRE), que son activados por el factor de transcripción que responde a metales (MTF-1) después de su ocupación por Zn, lo que es función de la provisión de Zn dietario; 2) elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE); 3) elementos activados por proteínas STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción) a través de la señalización por citoquinas; 4) elementos de respuesta a antioxidantes o electrófilos (ARE) activados en respuesta al status redox. La metilación puede reprimir la expresión de apo-MT en algunos tipos de tumores. El pool celular de Zn es influenciado por el consumo de Zn y la actividad de los transportadores de Zn, y sirve como fuente de Zn a la MT. La apo MT (T) y la MT pueden servir para retirar o donar Zn, respectivamente, desde y hacia las Zn metaloproteínas. La apo MT es más susceptible a la proteólisis que la Zn (y Cd)-MT, por lo que el recambio y la acumulación celular de MT está ligada directamente a la disponibilidad de Zn desde los pools intracelulares. Los numerosos sitios de coordinación para el Zn de las proteínas (factores de transcripción, moléculas de señalización y moléculas adaptadoras que usan dedos de Zn para la interacción proteína-proteína) proveen la oportunidad para que el nivel celular de MT influya procesos claves, que incluyen regulación de genes, proliferación y diferenciación celulares, transducción de señales y apoptosis, como así también influencia el daño oxidativo causado por el estrés oxidativo y por electrófilos.

Excreción

La mayor parte de la excreción del Zn en rumiantes se realiza a través de las heces y una muy pequeña parte a través de la orina (Miller, 1970). Con consumos normales del mineral, el Zn que se recoge en heces es primariamente Zn no absorbido (McDowell, 1992). La secreción “endógena” de Zn hacia el lumen intestinal se realiza vía secreciones pancreática, biliar e

intestinal propiamente dicha, a través de un flujo serosa-mucosa (Cousins, 1985). Stake et al. (1974) sugieren que el páncreas contribuye con el 25 % o menos de las pérdidas endógenas de Zn en bovinos. La excreción endógena en su conjunto responde en forma rápida a fluctuaciones en el contenido dietario de Zn, pero probablemente, en cantidades limitadas (King et al., 2000).

Figura I.3. Representación esquemática de la regulación del gen de la metalotioneína y la función de la proteína (adaptado de Davis y Cousins, 2000).



Control homeostático y homeorrético del metabolismo del zinc

La habilidad para mantener constante el medio interno frente a condiciones externas variables es esencial para la supervivencia. Esto es llamado homeostasis si el flujo de nutrientes dentro del organismo está en estado de equilibrio y es llamado homeorrexis si hay retención (o secreción) continua de un nutriente como ocurre en el crecimiento, la reproducción o la lactación.

Los estudios experimentales con ratas demostraron una capacidad para mantener un relativamente constante nivel de Zn en el cuerpo con consumos dietarios que variaron hasta en 10 veces. Cuando la concentración de Zn en el alimento varió entre 10 y 100 mg/kg, el contenido de Zn total del cuerpo se mantuvo constante alrededor de 30 mg/kg. La concentración corporal varió sólo cuando los niveles de Zn en el alimento estuvieron por debajo de 10 mg/kg o por encima de 100 mg/kg, lo que demostró la falla de los mecanismos homeostáticos (Kirchgessner, 1993). El trabajo de Johnson et al. (1993) ha demostrado que también los seres humanos tienen la capacidad de regular el contenido de Zn total en un rango de 10 veces en el consumo.

Los mecanismos primarios para mantener la homeostasis del Zn son los cambios en la absorción y en la excreción del mineral en el tracto gastrointestinal. Los cambios en la excreción renal y en la redistribución tisular y celular del Zn, son mucho menos importantes y sólo ocurren con extremadamente bajos o altos consumos de Zn.

Weingand y Kirchgessner (1978b) llevaron a cabo un estudio de balance de Zn en ratas. La eficiencia de absorción fue casi del 100 % cuando se proveyó una dieta desprovista de Zn y del 55 % cuando se aportaron 0,46 mg/día. Sin embargo, la excreción fecal endógena de Zn varió unas 30 veces, desde 0,0065 hasta 0,196 mg/día. Las pérdidas endógenas fecales de Zn tienen dos componentes: una pérdida metabólica inevitable u obligatoria y una pérdida homeostáticamente regulada

En un estudio en humanos (Jackson et al., 1984) con dosis crecientes de Zn (7,2; 15 y 30,9 mg/día) se halló que la excreción endógena cambió más rápidamente que la absorción.

Existe una acción sinérgica de la absorción gastrointestinal y la excreción endógena en el establecimiento de la homeostasis del Zn. La eficiencia de absorción responde más lentamente, pero su capacidad para hacer frente a fluctuaciones en el Zn dietario es mayor (King et al., 2000).

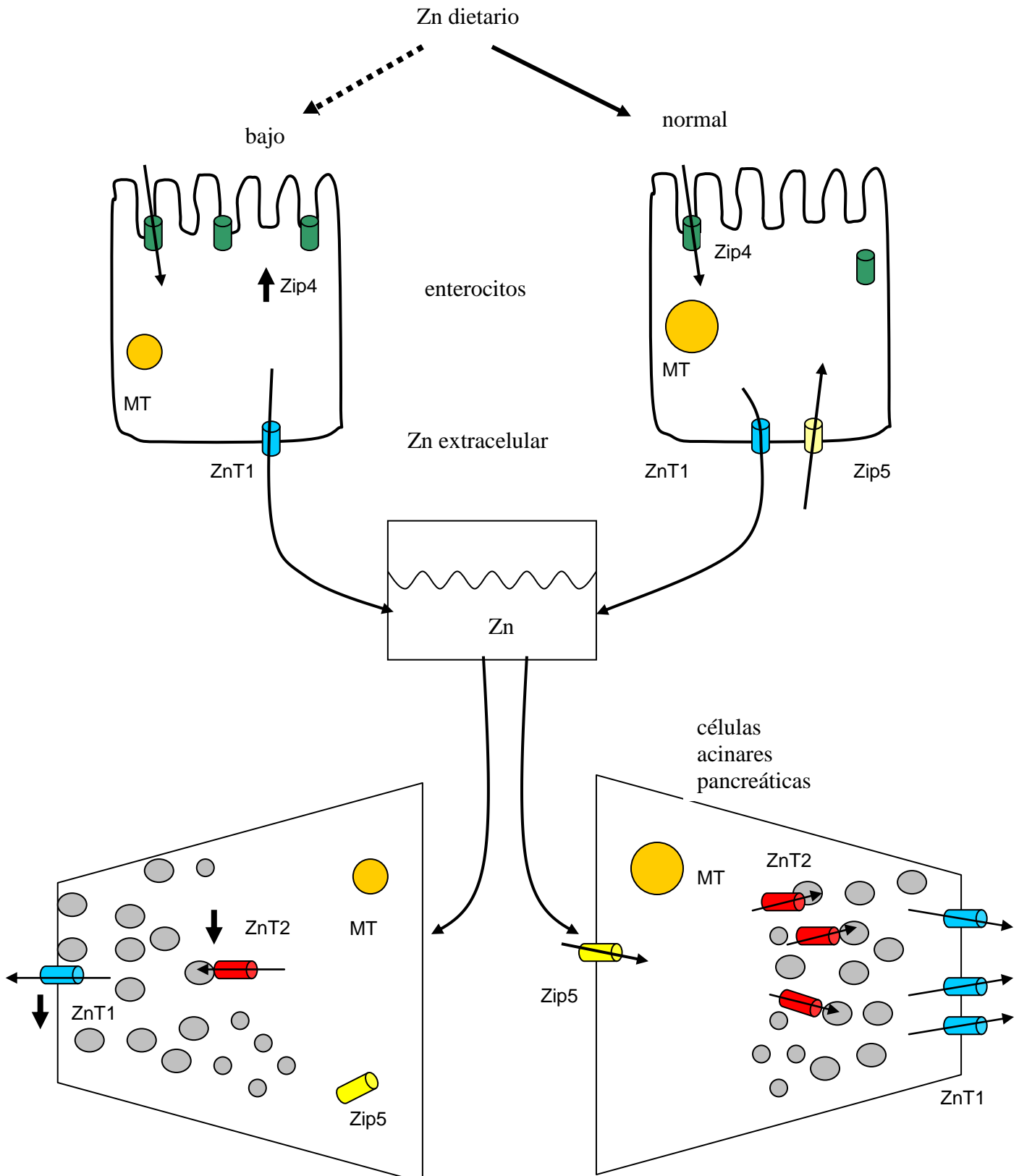
El porcentaje de Zn dietario absorbido dependerá de la cantidad de Zn en la dieta y de los requerimientos del animal, que a su vez son determinados por el status previo del animal, su estado fisiológico y el tipo y nivel de producción.

A medida que el Zn dietario se incrementa, el porcentaje absorbido disminuye, y viceversa. Menard y Cousins (1983) encontraron que la velocidad de absorción de Zn por parte del intestino delgado era el doble en ratas deficientes que en ratas suficientes en Zn. La afinidad por el Zn no estaba aumentada, de manera que el incremento en la tasa de transporte, probablemente, se debía a un aumento en el número de transportadores que podían capturar el Zn libre o unido a ligandos de bajo peso molecular.

En un ensayo realizado en ratas, la absorción verdadera de Zn, varió desde casi el 100 % hasta cerca del 30 %, a medida que el nivel dietario aumentaba (Weigand y Kirchgessner, 1978a). En humanos, la absorción fraccional fue de 25 % con un consumo de 16,47 mg/día y de 49 % con un consumo de 5,56 mg/día (Wada et al., 1985). En vacas lecheras la absorción verdadera de Zn era del 53,4 % con 16,6 ppm de Zn en la dieta y del 34,8 % con 39,5 ppm,

mientras que la excreción por la leche se había duplicado (Neathery et al., 1973a). Cuando vacas lecheras en producción fueron pasadas de una dieta normal a una deficiente (6 ppm de Zn) la absorción aparente aumentó del 22 al 51 % al término de una semana, y luego siguió aumentando hasta alcanzar el 66 % a la sexta semana (Kirchgessner et al., 1978).

Figura I.4. Cambios en los transportadores de Zn en respuesta al Zn dietario (adaptado de Cousins et al., 2006; ver indicaciones en el texto).



El incremento en la eficiencia de la absorción de Zn con la reducción en el consumo permite que más cantidad porcentual de Zn sea absorbida, pero, a pesar de ello, la cantidad absoluta absorbida es menor que con niveles normales (King et al., 2000).

Stake et al. (1975) determinaron que, con dietas bajas en Zn (16,6 ppm) la absorción verdadera era de 49,7, 47,2 y 53,4 % en terneros de 2 y 6 meses y en vacas lecheras, respectivamente. Esto demuestra que los bovinos adultos tienen capacidad para responder ante los incrementos en los requerimientos que representa la lactancia y contradice algunos indicios acerca de que la capacidad de absorción de Zn desciende con la edad. Los niveles de Zn en leche rondan los 4 $\mu\text{g/ml}$, con concentraciones dietarias de 40 ppm del metal. Con dietas deficientes (17 ppm) pueden bajar hasta 3,3 $\mu\text{g/ml}$ y con niveles dietarios altos, pero no tóxicos, alcanzan una meseta de alrededor de 8 $\mu\text{g/ml}$ (Miller, 1975), lo que sugiere que la excreción de Zn en leche cumple un cierto papel en la regulación homeostática del mineral.

Durante la última fase de la preñez, aumenta considerablemente la absorción de Zn en ratas y cerdas, para hacer frente a las mayores demandas de los fetos y de la subsecuente lactación (Kirchgeßner et al., 1993).

El status previo de Zn del animal también influye notablemente, ya que animales deficientes tienen una absorción neta mucho mayor (Miller, 1970), de modo que colocados con dietas suficientes en Zn conservarán durante un corto período su capacidad de absorción aumentada.

Las secreciones endógenas de Zn en las primeras porciones del intestino delgado juegan también un rol importante en la homeostasis del mineral, aunque una parte considerable de ese Zn puede ser potencialmente absorbido en el trayecto del intestino delgado (Miller, 1970). Weigand y Kirchgeßner (1978b) observaron que a medida que el Zn dietario se incrementaba más allá de los requerimientos, la secreción endógena de Zn aumentaba.

De particular interés son los estudios con individuos que consumen dietas bajas en Zn durante largos períodos de tiempo. Lee et al. (1993) efectuaron un estudio con hombres que consumieron durante 6 meses cantidades subóptimas de Zn (4,12 mg/día). Después de 2 meses, la tasa fraccional de Zn aumentó de 44 % a 65 % y las pérdidas endógenas fecales se redujeron de 4,25 a 3,14 mg/día. Durante el resto del ensayo, la tasa fraccional se mantuvo relativamente constante, pero las pérdidas endógenas continuaron bajando: 2,61 y 1,76 mg/día a los 4 y 6 meses respectivamente. Después de 6 meses esta reducción en las pérdidas endógenas fecales permitió alcanzar un balance neto positivo de 0,30 mg/día. Estos datos sugieren que los ajustes en la homeostasis del Zn con bajos consumos no ocurren rápidamente, sino que los cambios continúan durante meses, posiblemente hasta que el equilibrio sea eventualmente alcanzado.

Otro estudio que reafirma estos conceptos fue realizado comparando un grupo de mujeres que consumía 5,2 mg de Zn/día y otro que consumía 8,1 mg/día (Sian et al., 1996). Aunque la cantidad ingerida en el segundo grupo era un 35 % más, la tasa fraccional de absorción era de 34 y 31%, respectivamente. Así, la cantidad absoluta absorbida de Zn era de 1,63 y 2,75 mg/día. Sin embargo, el balance de Zn fue similar, ya que la excreción endógena fue mayor en el segundo grupo (2,29 mg/día) que en el primero (1,31 mg/día).

Estos dos estudios con consumos bajos de Zn muestran que la excreción endógena de Zn está directamente relacionada con la cantidad total de Zn absorbida después que los individuos han establecido un estado de equilibrio. La cantidad de Zn que es absorbido influencia la cantidad de Zn en los pools tisulares, que a su vez está asociada con la cantidad de Zn endógeno excretado en las heces.

En comparación con la cantidad de Zn perdida a través del tracto gastrointestinal, las pérdidas renales son bajas y tienden a permanecer constantes en un amplio rango de consumos del mineral. En humanos, la excreción renal declina sólo cuando los consumos están por debajo de 3,27 mg de Zn/día, un tercio de los niveles recomendados (Johnson et al., 1993). Algunos factores, además de la ingesta muy baja de Zn, pueden afectar la excreción renal de este mineral. Se ha demostrado que la infusión de cisteína y el glucagon pueden incrementarla, mientras que la insulina contrarresta la acción del glucagon (King et al., 2000).

Otras pérdidas adicionales de Zn son el sudor, la descamación epitelial, el crecimiento de lana, pelo y uñas, el semen y la menstruación. Las pérdidas por sudor y descamación en el ser humano pueden declinar hasta un 50 % cuando el consumo de Zn es bajo (3,6 mg/día) (Milne et al., 1983). Las pérdidas por semen declinan en la deficiencia de Zn, pero parecen ser debidas más a una disminución del eyaculado que a cambios en la concentración del mineral en el mismo (Hunt y Johnson, 1990).

Los mecanismos moleculares relacionados con la homeostasis del Zn comenzaron a ser mejor comprendidos con el descubrimiento de los transportadores de Zn, generándose un área de activa investigación en el presente. En un reciente ensayo realizado en intestino delgado de humanos (Cragg et al., 2005) se trabajó con un grupo control que ingirió una dieta que aportaba una cantidad de Zn para cubrir los requerimientos (8,2 mg de Zn/día) y un grupo suplementado con 25 mg adicionales de Zn, a partir de sulfato de Zn ($ZnSO_4$). La suplementación con Zn disminuyó la cantidad de ARNm de ZnT1 y aumentó la cantidad de ARNm de MT en mucosa intestinal, pero no modificó la cantidad de ARNm de ZnT4, ZnT5, Zip1 y Zip4. Sin embargo, cuando se evaluó la concentración celular de los transportadores por la técnica de “inmunoblotting”, las muestras de sujetos suplementados tenían menores niveles de ZnT1 (3,7 veces menos), ZnT5 (1,8 veces menos) y de Zip4 (reducción a niveles indetectables). La disminución de las proteínas ZnT5 y Zip4 en ausencia de una disminución en los correspondientes ARNm puede resultar de una traducción reducida, de un incremento en la degradación de las proteínas, o de ambos. La concentración luminal intestinal de Zn con dietas normales se estima alrededor de 100 μM . Los autores también compararon el efecto de incrementar los niveles de Zn a 200 μM en el medio de cultivo de la línea celular intestinal Caco-2, simulando condiciones experimentales similares al ensayo in vivo con humanos. En este caso, hallaron que también había una disminución en los ARNm de ZnT5 y Zip4, lo que posiblemente haya reflejado mayores niveles de exposición al Zn en las células cultivadas o diferencias en las propiedades regulatorias entre el modelo de línea celular y el modelo in vivo.

En rata, la suplementación con Zn incrementó la cantidad de ARNm de ZnT1 en el intestino delgado (McMahon y Cousins, 1998; Liuzzi et al., 2001), a diferencia del trabajo con humanos de Cragg et al. (2005) donde el ARNm de ZnT1 disminuyó. Debido a que las condiciones dietarias fueron comparables, estas observaciones pueden indicar diferencias entre especies en términos de respuestas regulatorias al desafío con Zn.

En la deficiencia de Zn también ocurren cambios en la concentración tisular de Zn para conservar el Zn corporal. Como puede observarse en la Tabla I.2, aproximadamente el 60 % del Zn corporal se encuentra en el músculo esquelético y un 25 % en hueso, mientras que sólo una parte muy pequeña corresponde al plasma. Cuando los animales se alimentan con dietas deficientes en Zn o cuando tienen un consumo marginal de Zn durante un largo período de

tiempo, los ajustes homeostáticos pueden no ser suficientes para reemplazar las pérdidas de Zn y ocurre un balance negativo. Con una severa deficiencia de Zn (Jackson et al., 1982) el Zn corporal total de las ratas descendió un 30%, pero las pérdidas fueron diferentes entre los tejidos. La concentración de Zn cayó marcadamente en plasma (45%), hígado (19%), hueso (64%) y testículos (53%), pero permaneció constante en pelo, piel, corazón y músculo esquelético.

En estudios con bovinos, la concentración de Zn descendió, aunque en forma no muy marcada, en algunos órganos, como páncreas, hígado, riñón, intestino, pelo y hueso, pero no en músculo esquelético (Miller, 1970).

El Zn es sólo liberado a partir del músculo cuando este tejido está siendo catabolizado (Agget y Favier, 1993). No se comprende porqué se preserva el pool de Zn en músculo, cuando otros pools más vitales disminuyen y provocan, consecuentemente, la aparición de una serie de signos clínicos y bioquímicos. Posiblemente, la caída en el Zn plasmático después de una severa deficiencia de Zn es la señal para que ciertos tejidos incrementen la liberación del mineral y otros tejidos lo retengan.

Tabla I.2. Distribución del Zn corporal en humanos, con un peso de 70 kg (Jackson, 1989).

Tejido u órgano	Contenido (g)	Distribución (%)
Músculo	1,5	60
Hueso	0,5-0,8	20-30
Piel y pelo	0,21	8
Hígado	0,10-0,15	4-6
Estómago, intestino y páncreas	0,03	2
Riñones	0,02	0,8
Bazo	0,003	0,1
Sistema nervioso central	0,04	1,6
Sangre	0,02	0,8
Plasma	0,003	<0,1

La movilización del Zn desde el hueso en la deficiencia de Zn ha sido extensamente estudiada, pero los resultados son controvertidos, y una parte de las diferencias probablemente se relacione con la especie animal y la edad de los animales utilizados en los experimentos. Algunos trabajos indican que esta movilización depende de la tasa de resorción ósea y que el hueso sirve como secuestrante de Zn y no como reservorio. Al menos, el hueso no es un depósito convencional de Zn, ya que no hay un mecanismo para incrementar la liberación del Zn óseo durante una deficiencia. Sin embargo, un trabajo realizado con ratas en crecimiento (Zhou et al., 1993) demuestra que una pequeña parte del Zn óseo (10-20 %) puede ser liberado en la primera fase de la deficiencia marginal de Zn para cubrir los requerimientos de los tejidos blandos. El segundo y mayor pool de Zn óseo se libera muy lentamente como para proveer Zn en tiempos de necesidad. Coincidentemente, Emmert y Baker (1995) hallaron que el hueso y el hígado pueden almacenar Zn cuando los pollos son alimentados con dietas por encima del requerimiento mínimo, y que este Zn puede ser liberado en un subsecuente período de deficiencia para poder soportar un crecimiento normal durante una semana. En un ensayo de este trabajo se suministraron dietas purificadas que contenían 10,6 (suficiente) y

300 ppm de Zn (alto) durante 8 días. Cuando ambos grupos fueron cambiados a una dieta sin Zn, el primer grupo mostró depresión del crecimiento a partir del día 5 y los del segundo grupo a partir del día 8. La concentración de Zn en tibia fue más elevada durante la depleción en el segundo grupo y sólo bajó a niveles comparables a los del grupo control a los 8 días. Con el Zn hepático sucedió algo similar, pero disminuyó hacia el día 3, indicando que la reserva ósea de Zn fue más duradera.

Los resultados obtenidos con lechones (Bobilya et al., 1994) soportan la hipótesis de que en animales en crecimiento el Zn óseo puede ser movilizado y utilizado por un corto tiempo durante períodos de deficiencia. En este ensayo, la concentración de Zn en hueso (ilion) permaneció alrededor de 120 ppm en los cerditos control y pareados por consumo, pero disminuyó a 30 ppm en el grupo deficiente (4 ppm de Zn en dieta) al cabo de 4 semanas.

No existe ningún trabajo en rumiantes que permita suponer que el hígado cumpla una función de depósito importante, como sucede con el Cu, ni mucho menos que el hueso la cumpla.

La deficiencia de Zn en ratas se caracteriza por una reducción en el consumo y en el crecimiento. Si los animales son alimentados en forma forzada con una dieta deficiente en Zn, enferman rápidamente y mueren. En contraste, las ratas alimentadas con una dieta similar ad libitum sobreviven varias semanas más, aunque con signos de deficiencia de Zn y a expensas de su propio Zn tisular. Típicamente, desarrollan un patrón cíclico de consumo de alimento, de 3-4 días de duración, lo que causa el catabolismo de tejidos que contienen Zn, como el músculo, y la liberación del Zn endógeno para las funciones metabólicas críticas. La privación del catabolismo celular a causa de la alimentación forzada parece prevenir una respuesta homeostática frente a dietas extremadamente bajas en Zn, y la sobrevivencia disminuye (O'Dell y Reeves, 1989).

Se ha argüido que existen dos pools de Zn corporal: un pool funcional de Zn, localizado en aquellos tejidos y fluidos menos afectados por el consumo de Zn, y un pool intercambiable, que responde fuertemente a variaciones en el Zn dietario y que sería menos importante para el metabolismo. En realidad, serían varios pools intercambiables, de pequeño tamaño, ubicados en distintos órganos y tejidos (Swinkels et al., 1994). Probablemente, parte de este pool sea el Zn unido a la MT, que demostró ser una proteína distribuída en casi todos los órganos y tejidos.

Un enfoque utilizado en nutrición clínica, especialmente en humanos, para tratar de identificar el comienzo temprano de una deficiencia de Zn involucra la predicción del pool rápidamente intercambiable por medio del uso de isótopos estables. Fairweather-Tait et al., (1993) demostraron la factibilidad de usar una inyección endovenosa de Zn⁷⁰ y medir su cinética plasmática para estimar el tamaño de los pools en humanos. Así, pudieron distinguirse un pool pequeño, que se intercambia rápidamente con el plasma, y un pool mayor lentamente intercambiable. Miller et al. (1994), trabajando también con isótopos estables, hallaron que el pool que se intercambia con el plasma dentro de los dos días está fuertemente relacionado con el Zn dietario. Este es un área en el que se sigue trabajando en medicina humana (Tran, 2015), pero aún no existen trabajos en rumiantes.

El Zn plasmático representa menos del 0,1% del Zn corporal total. En un hombre adulto, el plasma contiene aproximadamente 3,5 mg de Zn. Debido a que todo el Zn absorbido (entre 3,3 y 4,9 mg/día) pasa por el plasma, el flujo hacia afuera del mismo debe ser rápido para mantener una concentración constante. King et al. (2000) determinaron, con dietas normales,

que la tasa de recambio del Zn plasmático era de unas 150 veces/día, lo equivale a 484 mg de Zn/día, o sea, un tercio del Zn corporal total. Al final del período de 5 a 6 semanas de depleción severa, la concentración de Zn en plasma cayó desde 0,78 a 0,26 mg de Zn/L, pero la tasa fraccional de recambio sólo se incrementó un tercio (200 veces/día). La cantidad de Zn total que se movió hacia los tejidos declinó de 484 a 271 mg/día, y esta reducción se asoció con el comienzo de los síntomas de deficiencia de Zn.

A modo de resumen, en la Tabla I.3 se enumeran los procesos homeostáticos relacionados con el Zn.

Tabla I.3. Procesos adaptativos implicados en la homeostasis del Zn (adaptado de Agget y Favier, 1993).

Exceso de Zn	↑	<p>Muerte.</p> <p>Lesiones y signos de intoxicación. Interferencia con otros nutrientes.</p> <p>Secuestro en tejidos. Excreción.</p> <p>Disminución de la absorción y aumento de la secreción en intestino.</p>
Niveles adecuados	↓	<p>Aumento de la absorción y disminución de la secreción en intestino.</p> <p>Redistribución tisular para proteger los pools vitales.</p> <p>Fase metabólicamente descompensada: disminución de la actividad de las Zn metaloenzimas.</p> <p>Fase de deficiencia clínica grosera: signos y lesiones característicos. Metabolismo de otros nutrientes perturbado.</p> <p>Muerte.</p>

Requerimientos nutricionales

El NRC (1996) recomienda un nivel de 30 ppm de Zn (base Materia Seca, MS) en el alimento, para todas las categorías de bovinos de carne. En bovinos lecheros (NRC, 2001) se fijó un requerimiento de 40 a 50 ppm. Sin embargo, algunos sistemas europeos recomiendan 50 ppm, tanto para bovinos de carne como lecheros (Kirchgeßner et al., 1993; Weiss, 1996). El requerimiento de Zn puede variar de acuerdo al criterio utilizado. El criterio generalmente usado en bovinos de carne es la ganancia de peso, pero, probablemente, sean necesarios mayores niveles para mantener una adecuada salud u optimizar el funcionamiento del sistema inmunitario. Es posible, entonces, que las recomendaciones europeas contemplen algún margen de seguridad razonable. En ovinos se recomiendan niveles de 20 a 33 ppm de Zn (NRC, 2007).

En monogástricos, como los cerdos, alimentados con dietas a base de granos de cereales y harina de soja, los requerimientos dietarios son mayores, y fluctúan entre 50 y 100 ppm, dependiendo de la categoría y nivel de producción (NRC, 2012).

Contenido de zinc en los alimentos

El contenido en Zn de los alimentos utilizados en rumiantes varía ampliamente. En general, se asume que las leguminosas tienen mayores concentraciones que las gramíneas, y que a medida que las plantas maduran, decrece su contenido en Zn (McDowell, 1992).

La interrelación suelo-planta es compleja. Una baja concentración de Zn en el pasto puede ser el reflejo de una deficiencia de Zn en el suelo, pero también de la presencia de factores que disminuyen su disponibilidad. En la provincia de La Pampa existe una gran proporción de suelos con deficiencia de Zn (González y Buschiazzo, 1997). Sin embargo, dentro de una misma zona existen muy amplias variaciones en la concentración de Zn en los forrajes, dependientes de la especie y la estación del año (Pechin et al., 1995). El rango óptimo de pH del suelo para la absorción de Zn por parte de las forrajeras está entre 5 y 7, al igual que para el Cu (Reid y Horvath, 1980). A medida que el pH del suelo se incrementa, disminuye la disponibilidad del Zn para la planta, pero éste no es el único factor. Las bajas temperaturas y el exceso de humedad también pueden disminuir la captación de Zn (McDowell, 1992).

Corbellini (1998) ha resumido una serie de datos obtenidos en nuestro país, hallándose los siguientes rangos de concentración de Zn en alimentos (en ppm, base MS): pasturas de gramíneas (14-25), pasturas de leguminosas (22-32), silo de maíz (10-69), heno de alfalfa (18-26), grano de maíz (13-18) y afrechillo de trigo (116-128).

Los granos de maíz y cebada tienen menores concentraciones de Zn (14-19 ppm) que los de avena y trigo (41 y 50), mientras que los suplementos proteicos de origen vegetal (harinas de soja y girasol) tienen valores de alrededor de 60 ppm (NRC, 1982, 2001).

Para los monogástricos (cerdos y aves) se reconoce que las dietas más comunes a base de cereales y suplementos proteicos de origen vegetal tienen una baja disponibilidad de Zn, de manera que la suplementación es rutinaria.

El NRC (2001) asume, para el cálculo de los requerimientos dietarios de Zn, un coeficiente de absorción verdadera del 15 %, basándose en los trabajos de Miller y Cragle (1965), que halló valores entre 12 y 20 % en bovinos.

Deficiencia de zinc y ensayos de suplementación

Los **signos clínicos** de la deficiencia de Zn, prácticamente los mismos en todas las especies, son: disminución en el consumo de alimentos, retardo o cesación del crecimiento, piel engrosada, escamosa y agrietada, pérdida de pelo y lana, fallas reproductivas en machos y hembras, anomalías esqueléticas, dificultosa reparación de heridas, etc. (Underwood, 1981; Mills, 1978).

Las **lesiones** características de la piel, a nivel histológico, son para e hiperqueratosis (Norrdin, et al., 1973; Mills, 1978) y dermatitis, especialmente en patas, morro, orejas y alrededor de los ojos (Ott et al., 1965). También se han descrito disminución del crecimiento del hueso endocondral y periostial y del cartílago epifisario, disminución del porcentaje de cenizas del hueso (Norrdin et al., 1973), hiperplasia epitelial irregular, con espesamiento del estrato córneo en la mucosa de la boca, ausencia de linfocitos T en timo, linfonódulos y bazo (Sanecki et al., 1985), hipertrofia e hiperqueratosis de la mucosa del esófago (Whitenack et al., 1978; Miller y Miller, 1960).

Anorexia

La disminución en el apetito es el primer signo visible de deficiencia de Zn, comienza dentro de los 3 a 5 días de haber comenzado con la dieta deficiente y es el principal factor que explica la reducción en el crecimiento. Los hallazgos más relevantes asociados con la anorexia han sido descritos en ratas: existen ciclos de 3-4 días de consumo variable; los animales comen menos veces al día, pero el tamaño de cada comida es igual al de las ratas normales; la alimentación forzada de las ratas deficientes es altamente perjudicial para su salud y la suplementación con Zn restaura rápidamente el consumo a los niveles normales (Shay y Mangian, 2000).

La regulación central del apetito implica mecanismos complejos en los que participan una serie de sustancias: neurotransmisores, como noradrenalina y serotonina; péptidos, como neuropéptido Y (NPY), galanina, β -endorfina, leptina y orexina. Okada et al. (2013) han demostrado que la deficiencia de Zn en ratas está relacionada con el incremento o la disminución en la expresión de varios genes en el diencefalo (que incluye tálamo y hipotálamo) relacionados con el anormal comportamiento alimenticio.

Leibowitz y Brown (1980) demostraron que cuando la noradrenalina exógena es administrada en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo el consumo de alimento de corto plazo se incrementa. Essatara et al. (1984) evaluaron los efectos de la administración central de noradrenalina, muscimol (un agonista del ácido γ -aminobutírico) y bromergocriptina (un agonista de la dopamina) en ratas deficientes en Zn y control. Los tres compuestos fueron menos efectivos o incapaces de producir un efecto estimulador sobre el consumo en ratas deficientes. Los autores sugieren que esta disminución en la respuesta de las ratas deficientes en Zn es debida a una menor capacidad de respuesta de los receptores en el sistema nervioso central.

La deficiencia de Zn altera la predilección por determinados tipos de nutrientes. Cuando se ofrecieron por separado carbohidratos, grasas y proteínas puras, las ratas alimentadas con niveles adecuados de Zn tuvieron un patrón de consumo del 70 %, 15 % y 15 % respectivamente. Las ratas deficientes mostraron un consumo reducido de alimento, pero casi

el 100 % de esta reducción se debió al menor consumo de carbohidratos (Rains y Shay, 1995). Sin embargo, ni en este estudio, ni en otro posterior (Shay y Mangian, 2000) pudo demostrarse evidencia de que las ratas disminuyen selectivamente el consumo de proteína durante la deficiencia de Zn. Debido a que el consumo de carbohidratos está incrementado cuando se administra centralmente el NPY, se hipotetizó que la regulación del NPY podría estar relacionada con la anorexia por deficiencia de Zn. Por el contrario, Reeves (2003) halló que las ratas deficientes en Zn seleccionaban dietas con menor nivel de proteína que las ratas normales.

Aunque el NPY puede ser sintetizado por todas las neuronas, su síntesis es particularmente alta en los cuerpos celulares del núcleo arqueado del hipotálamo, un alto porcentaje de cuyas neuronas se proyectan al NPV. El NPY exógenamente administrado en el NPV es el agente testado que más incrementa el apetito, cuando fueron evaluados sobre una base molar (Páez y Mayers, 1991). Los estudios con ratas (Selvais et al., 1997; Lee et al., 1998) no pudieron demostrar una disminución de los niveles de NPY en hipotálamo de animales deficientes, ni una reducción en la respuesta del consumo frente a la infusión de NPY exógeno directamente en el NPV del hipotálamo. Por el contrario, Williamson et al. (2002) hallaron que el consumo era estimulado unas 2,5 veces en ambos grupos cuando se administraba NPY al comienzo del día, pero seguía siendo menor (la mitad) en el grupo deficiente. Los autores concluyen que la base de la reducción en el consumo en los animales deficientes en Zn no se relaciona con la cantidad ni con la liberación de NPY, ni con una disminución en la transducción de señales, sino que parece haber otros factores que limitan el consumo.

Por otro lado, las concentraciones de galanina fueron mayores en NPV de ratas alimentadas con dietas normales que en las ratas deficientes (Kennedy et al., 1998). Estos datos sugieren que la galanina es normalmente regulada durante la deficiencia de Zn y que los niveles del NPY pueden estar desregulados, y que otros factores hipotalámicos, tales como el factor liberador de corticotrofina, que es un factor contrarregulatorio del NPY, pueden jugar un rol importante en el hipotálamo durante la deficiencia de Zn (Shay y Mangian, 2000).

La leptina es un péptido producido por el tejido adiposo e involucrado en la regulación del apetito y el mantenimiento del peso corporal. La leptina es transportada vía sanguínea y se une a receptores específicos en el hipotálamo. Altos niveles de leptina disminuyen los niveles hipotalámicos de NPY y de su ARNm, lo que indicaría una disminución del apetito en respuesta a la señal de adecuadas reservas de energía corporal (Erickson et al., 1996). Sin embargo, como los ratones sin el gen del NPY (“NPY knockout”) responden a las inyecciones de leptina con saciedad, deben existir otros blancos para la leptina en el hipotálamo en adición al NPY, por ejemplo, galanina, hormona melanocito estimulante, neurotensina y pro-opiomelanocortina. Los niveles circulantes de leptina son reducidos durante la deficiencia de Zn en ratas. Esta reducción se debe a una menor cantidad de grasa presente y a una disminución de la cantidad de leptina producida por gramo de tejido adiposo (Mangian et al., 1998; Ott y Shay, 2001). Como la síntesis de leptina es estimulada por la insulina, puede hipotetizarse que la falla en la acción de la insulina puede ser una explicación de por qué la síntesis de leptina se ve reducida en la deficiencia de Zn. Estos menores niveles de leptina incrementan los niveles de NPY en hipotálamo, pero, paradójicamente, no estimulan el consumo, posiblemente debido a una “resistencia” a la acción del mismo durante la deficiencia de Zn (Shay y Mangian, 2000). Esta resistencia podría implicar defectos en la secreción celular, en el procesamiento del péptido o en la transducción de señales. Sin embargo, la disminución de la leptina podría explicar en parte los efectos de la deficiencia de

Zn sobre algunos parámetros reproductivos, ya que en los tejidos reproductivos existen receptores para la leptina (Barash et al., 1996).

Por otro lado, la perturbación en la percepción de distintos sabores ha sido descrita en seres humanos. Se ha demostrado que en la deficiencia de Zn disminuye la expresión de los genes correspondientes a los receptores del sabor amargo y salado, denominados TAS2R y ENaC, respectivamente (Ikeda et al., 2013).

Apoptosis

La apoptosis, llamada muerte celular dirigida por genes o, menos correctamente, muerte celular programada es un mecanismo biológico requerido para la remoción de células superfluas, mutantes o moderadamente dañadas. En la mayoría de los tejidos de los mamíferos adultos saludables ocurre a una tasa baja, complementando la mitosis, en un estado estable de cinética que determina el tamaño y la forma de tejidos y órganos. La apoptosis es importante durante el desarrollo embrionario y en el sistema inmunitario, y se ve afectada por factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. Su desregulación (insuficiencia o exceso) es central en mecanismos patogénicos de muchas enfermedades, como desórdenes neurodegenerativos, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades autoinmunes y cáncer (Wyllie, 1997).

Las células que entran en el proceso apoptótico sufren un conjunto de cambios estructurales que son consistentes en todos los tipos celulares. Estos incluyen la separación de las células murientes de sus vecinas, el ampollado de la membrana plasmática, la condensación del citoplasma, el incremento de la densidad celular y la compactación y segregación de la cromatina para formar masas densas cercanas a la membrana nuclear. La condensación de la cromatina comienza en la periferia del núcleo y más tarde involucra la mayoría del mismo. Esto es seguido de fragmentación nuclear y la formación de brotes en la célula, que producen cuerpos apoptóticos que se mantienen en cavidades lumbinales o son fagocitados. Esto contrasta con la necrosis, en la cual la muerte y la lisis celulares que siguen a una injuria de tipo físico, químico u osmótico liberan enzimas citoplasmáticas potencialmente tóxicas sobre las células vecinas como así también factores quimiotácticos que pueden iniciar una reacción local inflamatoria (Mattson, 2000; Truong-Tran et al., 2000).

Se ha demostrado que la deficiencia de Zn incrementa marcadamente la frecuencia de células apoptóticas en ciertos tejidos y órganos, como epitelio intestinal, piel, linfocitos tímicos, testículos y células acinares pancreáticas (Sunderman, 1995). Es por ello que una serie de desórdenes, tales como malformaciones fetales y fallas en el sistema inmunitario, que acompañan la deficiencia de Zn, pueden tener como origen común, al menos en parte, un aumento de los fenómenos apoptóticos (Fraker, 2005; Maclean, 2005).

Los fetos de ratas deficientes en Zn experimentan malformaciones congénitas debidas a una excesiva apoptosis, especialmente defectos en el cierre del tubo neural (Record et al., 1985). En ratones adultos, la deficiencia de Zn redujo entre un 30 y un 70 % el compartimento de las células B de la médula ósea. Las mayores diferencias se hallaron entre las células pre B, pero hubo una normal supervivencia de células anteriores en la progenie, llamadas pro B. Estas células más inmaduras expresan mayores cantidades de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, que previenen la liberación del citocromo C desde la mitocondria (King et al., 1995). Similares resultados fueron hallados en el timo de ratones, donde la deficiencia de Zn aceleró la apoptosis entre un 50 y un 300 % en las células pre-T (King et al., 2002). Este fenómeno,

sostenido en el tiempo, puede contribuir a la atrofia tímica y a la reducida producción de linfocitos necesarios para mantener el sistema inmunitario periférico.

La involución del timo en animales deficientes en Zn puede ser debida al aumento de la apoptosis de los timocitos como consecuencia de los excesivos niveles de glucocorticoides circulantes (Fraker y Telford, 1997). Este y otros estudios han demostrado fehacientemente que la producción de glucocorticoides endógenos, a los niveles hallados en la deficiencia de Zn, son suficientes para inducir la apoptosis en células precursoras, y que la adrenalectomía o la remoción de los glucocorticoides provee una sustancial protección para los precursores de los linfocitos en médula ósea y timo de animales Zn deficientes (Fraker y King, 2004). Pero también la apoptosis puede resultar directamente de una declinación del Zn intracelular, a juzgar por los resultados *in vitro* de Treves et al. (1994), o bien un efecto sinérgico de la deficiencia de Zn y concentraciones subóptimas de otros inductores apoptóticos (Zalewski et al., 1993).

La suplementación con Zn puede proteger contra ciertos agentes tóxicos que inducen apoptosis *in vitro*. Por ejemplo, Waring et al. (1990) demostraron que el Zn bloqueó la apoptosis inducida por la micotoxina esporidesmina en macrófagos y linfoblastos T. En conejos, la administración tópica de altas concentraciones de Zn en el ojo después de una queratectomía superficial previno significativamente la pérdida por apoptosis de queratinocitos (Kuo et al., 1997).

Varios trabajos se han realizado con el objetivo de hallar las moléculas blanco del Zn en la prevención de la apoptosis. Algunos estudios se han focalizado sobre la endonucleasa Ca-Mg dependiente y la caspasa-3. Sin embargo, hasta el momento la caspasa-6 es el blanco molecular más sensible a la acción del Zn a concentraciones fisiológicas de 10 $\mu\text{mol/l}$. La caspasa-6 es responsable de la hidrólisis de ciertas proteínas y la disolución de la membrana nuclear. Además, fracciona a la forma proenzimática de la caspasa-3 y produce la forma activa caspasa-3, el efector central de la cascada apoptótica (Truong-Tran et al., 2000). Existen proteínas de la membrana mitocondrial de la familia Bcl-2-like que poseen propiedades antiapoptóticas, mientras otras proteínas de la familia Bax-like son proapoptóticas. Fukamachi et al. (1998) hallaron que la suplementación de Zn incrementó la relación Bcl-2/Bax, incrementando así la resistencia a la apoptosis en células cultivadas. Otro potencial blanco para el Zn pueden ser los microtúbulos del citoesqueleto, pero su rol no está aún claro (Truong-Tran et al., 2000).

Diabetes

Ha sido demostrado que la suplementación con Zn en los animales y el hombre mejora el control glucémico en la diabetes tipo I y II, y los mecanismos subyacentes han sido objeto de investigación.

El Zn es necesario para asegurar un apropiado almacenamiento y maduración de la insulina en las vesículas secretorias, ya que le provee estabilidad estructural a la forma de almacenamiento de la insulina, un hexámero sólido que requiere dos átomos de Zn (Chausmer, 1998). El transporte de Zn hacia adentro de las vesículas secretorias es llevado a cabo por el ZnT8 (Chimienti et al., 2006). Defectos genéticos relacionados con el gen de este transportador pueden jugar un rol importante en el desarrollo de la diabetes tipo 2 y en la progresión y severidad de la diabetes tipo 1 (Jansen et al., 2009).

Por otro lado, el Zn tiene un efecto positivo sobre la transducción de señales intracelulares de la insulina, que llevan finalmente a la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana plasmática y a la expresión de genes específicos que afectan el metabolismo de la glucosa. Además, el Zn ejerce un efecto protector sobre el estado diabético inhibiendo la muerte de células β del páncreas inducida por citoquinas vía supresión de la secreción de IL- 1β por monocitos/macrófagos, y suprimiendo la activación del factor nuclear κB (NF κB) (Jansen et al., 2009).

Crecimiento

La disminución o cesación del crecimiento causada por la deficiencia de Zn es debida a un menor consumo de alimento, pero también, en parte, a una menor eficiencia de conversión alimenticia (Underwood, 1981). En relación a esta caída en la conversión alimenticia, los estudios de Jing et al. (2009) con ratas sugieren que puede haber limitaciones en la digestión intestinal, debido a una menor actividad de amilasa, maltasa y proteasa. Por otro lado, Sommers y Underwood (1969) hallaron una mayor excreción urinaria de N en los corderos deficientes en comparación con los controles pareados por consumo, lo que indica una falla en el metabolismo de las proteínas. Las ratas deficientes en Zn sufren anorexia marcada, pero la reducción en el consumo de energía no parece ser el primer factor limitante, ya que cuando son alimentadas en forma forzada fallan en corregir su crecimiento y se exacerban los signos clínicos de la deficiencia (Park et al., 1986).

Los primeros trabajos sobre el tema postulaban que la deficiencia de Zn puede acarrear una disminución en la síntesis o secreción de somatotrofina en ratas (Kirchgessner y Roth, 1985; Root et al., 1979). Cunningham et al. (1991) demostraron que la dimerización de la hormona de crecimiento (GH) es necesaria para un correcto almacenamiento en los gránulos secretorios. Dos átomos de Zn son necesarios por cada dímero, y la unión se produce específicamente en los residuos His18, His21 y Glut174. Los defectos en el empaquetamiento y almacenamiento en las vesículas trans-Golgi pueden estar asociados con una disminución en la secreción de GH (Petkovic et al., 2013). Sin embargo, algunos hallazgos en torno a la relación entre deficiencia de Zn y crecimiento son controvertidos, y aún no se ha definido el primer rol limitante del Zn en la proliferación celular.

Los resultados de McNall et al. (1995), en ratas, sugieren que el retardo del crecimiento está también relacionado con una disminución de los receptores para la GH en el hígado y de la síntesis del factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I). Similares resultados fueron informados por Droke et al. (1993), quienes hallaron, en corderos deficientes en Zn, mayores concentraciones de somatotrofina en respuesta a la hormona liberadora de somatotrofina, pero menores niveles de IGF-I. Ninh et al. (1995) observó que los bajos niveles séricos de IGF-I en ratas deficientes estaban cerradamente asociados con una disminución de la expresión del gen del IGF-I en el hígado, de los receptores hepáticos para GH y de los niveles circulantes de proteína transportadora de GH. Si bien esto es cierto, el mantenimiento de los niveles séricos de IGF-I por administración exógena o por inducción del consumo de alimento con acetato de megestrol en ratas deficientes no corrige la inhibición del crecimiento (Browning et al., 1998). Por lo tanto, los cambios en el eje GH-IGF-I no pueden explicar totalmente la cesación del crecimiento observada en la deficiencia de Zn (MacDonald, 2000).

La timidina quinasa cataliza la fosforilación la deoxi-timidina, y la actividad de esta enzima se incrementa dramáticamente durante la fase G1 y la primera etapa de la fase S del ciclo

celular. La disminución de la actividad de la timidina quinasa ocurre antes de la declinación del consumo de alimento y por lo tanto no está asociada con la caída en la disponibilidad de nutrientes. La disminución en la síntesis de ADN, que afecta la división y proliferación celulares, puede ser debida a la reducción de la actividad de la timidina quinasa (Chesters et al., 1990). La misma no es una Zn metaloenzima, pero el Zn parece regular la transcripción del gen de la timidina quinasa a través del factor de transcripción que se une a la región promotora de este gen. Sin embargo, además de la disminución del ARNm de la timidina quinasa, la deficiencia de Zn puede afectar la entrada de las células en fase S a través de un mecanismo todavía no identificado (MacDonald, 2000).

La acción de los factores de crecimiento sobre la división celular requiere la unión del ligando a su receptor, el que a su vez activa los caminos de señalización intracelular. El receptor del IGF-I tiene actividad tirosina-quinasa, lo que inicia una cadena de fosforilaciones. Las primeras proteínas en ser activadas por el receptor del IGF-I son los sustratos con respuesta a la insulina 1 y 2 (IRS-1/2). Estas proteínas inician 3 vías distintas de señalización: fosfoinositol-3 quinasa (PI3-K), proteína quinasa activada por mitógenos (MAP-K) y PKC. La vía de PI3-K influye en la captación de sustratos y el metabolismo energético de la célula. La vía de la MAP-K resulta en la inducción de factores de transcripción que dirigen la proliferación celular. La PKC también induce la proliferación celular, pero a través de la captación de Ca (MacDonald, 2000).

Las investigaciones han demostrado que la fosforilación del receptor del IGF-I y de los IRS-1/2 no es afectada por la depleción de Zn. La actividad de la MAP-K de células cultivadas en presencia de un quelante del Zn no parece ser afectada. La PKC es una Zn metaloenzima, y además el Zn favorece la unión de la proteína al citoesqueleto, pero su actividad no fue afectada por la deficiencia de Zn en ratas. Se sospecha actualmente que el defecto es posterior a la acción de la PKC y podría estar en la captación de Ca extracelular a través de los canales de Ca de la membrana plasmática (MacDonald, 2000).

Dentro la gama de efectos sobre distintos tejidos, la deficiencia de Zn en animales experimentales causó considerables cambios en la diferenciación de condrocitos, osteoblastos y fibroblastos, afectando el crecimiento y la maduración ósea (Brandão-Neto et al., 1995), y la actividad de la placa de crecimiento epifisaria (Kurtou et al., 1987). Además, la glándula tiroidea también se ve afectada en una deficiencia de Zn, hallándose cambios atróficos y degenerativos en los folículos y disminución de los niveles circulantes de T3 y T4 (Gupta et al., 1997). Estos efectos podrían afectar indirectamente el crecimiento.

Sistema inmunitario

La deficiencia de Zn, ya sea experimental o naturalmente producida, afecta la inmunidad innata y adaptativa (Shankar y Prasad, 1998; Plum et al., 2010; John et al., 2010). La inmunidad innata tiene como elementos centrales a las células NK (“natural killer”), células dendríticas, macrófagos, células cebadas, granulocitos y componentes del complemento. La inmunidad adaptativa involucra a los linfocitos T y B. Este aspecto de la deficiencia de Zn ha sido ampliamente estudiada en animales de laboratorio y humanos, pero mucha menor cantidad de investigación ha sido producida en animales de interés zootécnico. Los posibles modos de acción del Zn sobre la función inmunitaria comprenden las metaloenzimas Zn dependientes (ADN y ARN polimerasas, timidina quinasa, etc.), la timulina, la estabilización

de membranas y del citoesqueleto, la regulación del fenómeno de apoptosis y el rol del Zn como molécula de señalización intracelular (Dardenne, 2002; Haase y Rink, 2009).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a las infecciones, pero sus respuestas no son específicas, ya que son similares frente a diferentes antígenos. Las funciones de la inmunidad innata son perturbadas en la deficiencia de Zn. Se han demostrado efectos sobre la quimiotaxis y el reclutamiento de granulocitos neutrófilos, la actividad de las células NK, la fagocitosis y producción de daño oxidativo en neutrófilos y macrófagos, y el número de neutrófilos (Ibs y Rink, 2003; Stafford et al., 2013).

La deficiencia de Zn afecta profundamente también la respuesta inmune específica, la cual comprende a las células T y B, que pueden producir células con memoria que responden rápidamente frente a los antígenos a los que han sido enfrentadas previamente.

Los linfocitos B representan las principales células de la inmunidad humoral. Después de su estimulación se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Se ha demostrado que son menos dependientes del Zn para su proliferación y por lo tanto la influencia de la deficiencia de Zn sobre las células B no es comparable a la situación de las células T. Sus precursores, especialmente las células pre-B y las células B inmaduras, son reducidas en su número absoluto en la deficiencia de Zn, mientras que los cambios en los linfocitos B maduros son sólo ligeros. Como se citara anteriormente, las diferencias se deben a la mayor o menor sensibilidad al fenómeno de apoptosis inducida por la deficiencia de Zn (Ibs y Rink, 2003), y la producción crónica de glucocorticoides provee, al menos en parte, la base para explicar el rol de la apoptosis sobre el aparato inmunitario durante una deficiencia de Zn (Fraker et al., 2000), aunque hasta un 50 % de la función de los linfocitos T helper puede perderse antes del pico de corticoides plasmáticos (DePasquale-Jardieu y Fraker, 1979). La deficiencia de Zn produjo menores niveles de anticuerpos frente al toxoide del tétanos en bovinos y la capacidad de respuesta fue restaurada cuando se proporcionó Zn suplementario (Spallholz y Stewart, 1989). En ratones deficientes en Zn, se demostró una disminución de la respuesta mediada por anticuerpos frente a antígenos T-dependientes y T-independientes (Fraker et al., 1986). Sin embargo, debido al fuerte efecto de la deficiencia de Zn sobre los linfocitos T, la producción de anticuerpos frente a antígenos T-dependientes es más sensible a la deficiencia de Zn que la producción de anticuerpos frente a antígenos T-independientes (Moulder y Stewart, 1989).

La memoria inmunológica es también afectada por la deficiencia de Zn, pero debido a que las células B maduras son más resistentes a la deficiencia de Zn a causa de los altos niveles de Bcl-2, la memoria de las células B es menos afectada que la respuesta primaria (Ibs y Rink, 2003). De todas maneras, los ratones deficientes en Zn que fueron inmunizados por segunda vez con GR de ovinos produjeron menores niveles de IgG. La respuesta inmune, 4 semanas después de comenzar a dar Zn suplementario, no había sido completamente restaurada, sugiriendo una disminución en el número o función de las células de memoria (Spallholz y Stewart, 1989).

Se ha demostrado que la inmunidad mediada por células es profundamente afectada, a través de una hipoplasia del timo, bazo, ganglios linfáticos, placas de Peyer y otros tejidos linfoides (Spallholz y Stewart, 1989). Los estudios de deficiencia de Zn en bovinos (Brummerstedt et al., 1971; Brummerstedt, 1977) y en cerdos (Miller et al., 1968; Shanklin et al., 1968) describen sustanciales reducciones en el tamaño del timo. Después de consumir una dieta deficiente en Zn durante 4 semanas, los ratones mostraron un 25 % del tamaño original del timo, y sólo unos pocos timocitos permanecían en la cápsula del timo. El porcentaje de

atrofia tímica excedió el de otros órganos y la pérdida de peso corporal. En los órganos linfoides periféricos (bazo, nódulos linfáticos) y la sangre los linfocitos T fueron progresivamente disminuyendo en número (Fernandes et al., 1979).

Las células T son células efectoras y reguladoras de la respuesta inmune específica. El Zn influye en la actividad de las células NK, como se citara anteriormente, y también la actividad de las células T citolíticas. La cantidad relativa de linfocitos T CD8⁺ CD73⁺ disminuye durante la deficiencia de Zn. Estas células son precursoras de los linfocitos citotóxicos (CD8⁺) y la molécula CD73 es necesaria para el reconocimiento de antígenos y la proliferación, como así también para la generación de procesos citolíticos. Por otro lado, se ha demostrado que el Zn está involucrado en el desarrollo de los linfocitos T, ya que la deficiencia de Zn provoca atrofia tímica (Ibs y Rink, 2003). La timulina es una hormona peptídica que posee 9 aminoácidos y es secretada por las células epiteliales del timo (Reggiani et al., 2009). El Zn está unido a la timulina en una relación estequiométrica 1:1, vía la cadena lateral de la asparagina y los grupos hidroxilo de dos serinas. La actividad de la timulina es dependiente de las concentraciones plasmáticas de Zn. La timulina es detectable en el suero de animales deficientes en Zn, pero la hormona no es activa (Shankar y Prasad, 1998). La timulina se liga a receptores de alta afinidad ubicados en los linfocitos T y regula la maduración de las células T inmaduras en el timo y la función de las células T maduras en la periferia. Además modula la liberación de citoquinas por las células mononucleares circulantes, induce la proliferación de los linfocitos CD8⁺ y asegura la expresión de receptores para la IL-2 (Ibs y Rink, 2003).

También los linfocitos T helper (CD4⁺) son afectados por la deficiencia de Zn, la que causa un desbalance entre las funciones Th1 y Th2. Las citoquinas Th2 (IL-4, -6 y -10) permanecen sin cambio en la deficiencia de Zn, mientras que las Th1 (interferón- γ e IL-2) disminuyen (Prasad, 2000; Hönscheid et al., 2009). La menor producción de IL-2 lleva a una menor actividad de las células NK y células T citolíticas (Prasad, 2007). En contraste al efecto de estimulación directa de los monocitos, el efecto sobre los linfocitos T es dependiente de los monocitos en el medio de cultivo. La liberación de interferón- γ y del receptor para IL-2 por las células T es mediado por la liberación por parte de los monocitos de IL1 y de IL-6, y de un contacto célula a célula entre monocitos y linfocitos (Rink y Kirchner, 2000). También se ha encontrado que la proliferación de linfocitos frente a mitógenos como la concavalina A y la fitohemaglutinina también es menor en animales deficientes, aunque en la literatura existe alguna contradicción al respecto (Walsh et al., 1994). Fernandes et al. (1979) y Fraker et al. (1986) hallaron una disminución en la reacción de hipersensibilidad retardada, en las respuestas mediadas por células frente a tumores y en la función de las células NK en ratones deficientes en Zn. En un trabajo con corderos severamente deficientes en Zn no se encontró una influencia marcada sobre los niveles de anticuerpos, pero sí una disminución en la relación linfocitos/neutrófilos en sangre y en la linfoproliferación frente a la fitohemaglutinina (Llalès, 1995).

Kidd et al. (1996) revisaron una serie de artículos en los que la suplementación con Zn generalmente mejoró algunos indicadores de respuesta inmunitaria en aves: producción primaria de anticuerpos frente a *Salmonella pullorum* y respuesta frente a la hemaglutinina-P.

Así, ha llegado a ser evidente que la deficiencia de Zn tiene un sustancial y relativamente específico impacto sobre las células de la progenie linfoide frente a las de la progenie mieloide. Esto puede representar una importante adaptación del sistema inmunitario, que protege la primera línea de defensa provista por la inmunidad innata (Fraker y King, 2001).

La rápida depleción de la médula ósea y el timo de los precursores de los linfocitos T y B a medida que la deficiencia avanza reduce la habilidad del sistema inmunitario para abastecer a la sangre periférica y los tejidos inmunes secundarios con un adecuado número de linfocitos, lo que explica la linfopenia y la disminución de las defensas (Fraker et al., 2000; Hönscheid et al., 2009). Opuestamente, la suplementación con altos niveles de Zn *in vitro* inhibe las funciones de las células T, y esto abre caminos a posibilidades terapéuticas en enfermedades autoinmunes de humanos, como artritis autoinmune o rechazo de injertos (Rink y Gabriel, 2000; Faber et al., 2004; Hönscheid et al., 2009). Se ha demostrado, asimismo, que la deficiencia de Zn puede agravar la respuesta en enfermedades inflamatorias crónicas del humano, lo que puede explicarse, al menos en parte, al incremento en la liberación de IL-1 β y a un aumento en la respuesta proliferativa los linfocitos T y B frente a IL-2 e IL-6 (Bonaventura et al., 2015).

En adición a los efectos a nivel celular, durante la fase aguda de una infección ocurren cambios en la homeostasis del Zn, especialmente una secuestro del Zn en el hígado vía Zip14, inducida por IL-6, que lleva a que este mineral permanezca almacenado en un complejo con la MT (Liuzzi et al., 2005).

Reproducción

Es dable esperar que el papel del Zn en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, la división celular y la acción de varias hormonas produzca efectos en el crecimiento y la reproducción. Sin embargo, es difícil asociar cambios enzimáticos específicos con los signos y lesiones característicos de la deficiencia de Zn. En general, los tejidos u órganos con mayores contenidos de Zn son aquellos con división celular más acelerada o con un activo metabolismo, y posiblemente sean los que sufran más tempranamente la deficiencia del mineral.

Todas las fases del proceso reproductivo en las hembras pueden verse afectadas por la deficiencia de Zn. En rumiantes se han encontrado mortalidad embrionaria, malformaciones fetales, disminución del porcentaje de parición, disminución del peso al nacimiento y al destete, etc. (Hidiroglou, 1979; Apgar y Fitzgerald, 1985). En ratas y ratones, una deficiencia severa de Zn lleva a una alta proporción de malformaciones fetales (Hurley y Swenerton, 1966; Sato et al., 1985) y a una disminución de la actividad de la timidina quinasa en los fetos (Dreosti y Hurley, 1975). Una importante cantidad estas malformaciones ocurren en el sistema nervioso central, acompañadas por una baja síntesis de ADN (Eckert y Hurley, 1977). Diamond y Hurley (1970) describieron, a nivel histológico, atrofia en la mayoría de los órganos, con lesiones llamasivas en la mucosa de esófago, lengua, faringe y estómago. Algunos datos experimentales demuestran que, aún en animales con dietas suficientes o marginalmente deficientes en Zn, eventos estresantes como una infección pueden resultar en una secuestro del Zn corporal, haciéndolo indisponible para el crecimiento de los fetos. Si esto sucede durante un período crítico en el desarrollo de órganos, la “deficiencia inducida por secuestro” puede llegar a ser teratogénica para el feto (Keen et al., 1993). Jankoski-Henning et al. (2000) indican que la deficiencia de Zn induce apoptosis de células embrionarias en ratas. Un posible mecanismo subyacente en estas alteraciones pueden ser el excesivo daño celular oxidativo después de cambios en los mecanismos antioxidantes. En un estudio con cultivos de células 3T3 (nerviosas), Oteiza et al. (2000) demostraron que la

deficiencia de Zn se asocia a defectos en la polimerización de microtúbulos, asociados a estrés oxidativo.

El examen del peso de las crías y sus madres muestra que la respuesta varía con la extensión de la privación de Zn en ratas. A muy bajos consumos de Zn, el peso de las madres deficientes, como porcentaje del peso de las madres control, era más bajo que el peso de las crías deficientes como porcentaje de las controles. Esto sugiere que los fetos tienen una alta prioridad por el Zn disponible, y el crecimiento fetal era soportado a expensas de la ganancia de peso materna. Con una deficiencia más moderada, el peso de las madres deficientes era similar al de las controles, pero el peso de las crías era todavía más bajo (Fosmire et al., 1977). Masters et al. (1983) compararon el crecimiento fetal en ratas que recibían dietas suficientes o dietas deficientes ad-libitum y en cantidades reducidas. El consumo de cantidades restringidas de la dieta deficiente llevó a catabolismo tisular de Zn y resultó en menos malformaciones y resorciones que las vistas en camadas provenientes de madres alimentadas ad-libitum con la dieta deficiente. Los estudios con animales experimentales sugieren que, con dietas dentro de rangos normales, los cambios en la absorción intestinal de Zn pueden ser los ajustes homeostáticos primarios para cubrir los requerimientos de la preñez (King, 2000). Sin embargo, en humanos se ha hallado que el Zn plasmático o sérico declina durante la gestación (Tamura y Goldenberg, 1996). En bovinos, también se halló una declinación hacia el fin de la gestación, pero fue más marcada en el parto, y más aún en aquellas vacas que tuvieron partos distócicos (Dufty et al., 1977).

En conejas (Shaw et al., 1974) y ratas (Swenerton y Hurley, 1968) la deficiencia de Zn lleva a anormalidades del ciclo estral y frena la ovulación. Además, el Zn es esencial para la función del receptor de estrógenos en la glándula mamaria (Shyamala y Yeh, 1975) y de los receptores de progesterona en el oviducto (Lohmar y Toft, 1975). Bunce y Vessal (1987) encontraron que las ratas deficientes en Zn presentan una reducida sensibilidad a los estrógenos, en ausencia de modificaciones en el número de receptores. El Zn influencia la formación de prostaglandinas (PG), ya que es cofactor de Δ -4 y Δ -5 desaturasas. El nivel de PGF_2 es más bajo en ratas deficientes en Zn (Song y Adham, 1985), lo que puede dificultar el mecanismo del parto. Apgar (1968) encontró que la deficiencia de Zn se relaciona con partos dificultosos y prolongados en ratas, con hemorragias, distocia y desórdenes placentarios, lo que puede asociarse también a fallas en los receptores a estrógenos. La redistribución del Zn tisular durante la lactancia y su homeostasis es perturbada por la deficiencia marginal de Zinc (McCormick et al., 2015).

En los machos los efectos son igualmente pronunciados. Pitts et al. (1966) hallaron que la deficiencia de Zn en terneros causa una disminución del crecimiento testicular. Una severa deficiencia de Zn en carneros produjo atrofia de los túbulos seminíferos y cesación de la espermatogénesis (Underwood y Somers, 1969), en chivos (Neathery et al., 1973b) e hipogonadismo en ratas (Favier, 1992). Kumari et al. (2012) estudiaron los efectos de dietas deficientes en Zn sobre el crecimiento y la histología de testículos en ratas en crecimiento. Estos autores hallaron disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos y en el diámetro nuclear de las células de Leydig, y una significativa pérdida de espermatogonias tipos A y B, espermatocitos y espermátides. McClain et al. (1984) no hallaron defectos en la respuesta de la hipófisis frente a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) pero las células de Leydig tuvieron una respuesta menor a la gonadotropina coriónica humana (HCG) en las ratas deficientes, que, por lo tanto, mostraron niveles de testosterona un 50 % más bajos. En cerdos deficientes en Zn, las células de Leydig fueron más pequeñas y mostraron anormalidades en el

retículo endoplásmico (Hesketh, 1982). El Zn está ligado, entonces, a la eficiencia de unión LH-receptor, y posiblemente a la acción de la α -reductasa, una enzima que convierte a la testosterona en un metabolito activo, la dehidrotestosterona, a juzgar por los hallazgos de Leake et al. (1984). Por otro lado, el receptor nuclear de la testosterona, al igual que todas las hormonas esteroides, tiene una estructura de “dedos de Zn” y el Zn es necesario para la función del receptor de la dehidrotestosterona en la próstata (Colvard y Wilson, 1984).

Ensayos de suplementación en animales de interés productivo

Una deficiencia de Zn, caracterizada por la presencia de signos no específicos, como menor producción de carne, leche o lana, disminución de la resistencia a infecciones y fertilidad subnormal puede estar más ampliamente distribuída de lo que se pensaba en un principio (Underwood, 1981). En nuestro país, algunos datos así lo parecen indicar (Ruksan, 1985). Nuestro grupo de investigación, en un trabajo de relevamiento realizado en el norte de La Pampa (Pechin et al., 1995), encontró que el contenido promedio de Zn en los pastos en otoño, invierno, primavera y verano era 39,3, 29,0, 20,9 y 27,0 ppm, base MS. El 53 y el 25 % de las muestras en primavera y verano, respectivamente, contenían menos de 20 ppm de Zn. En un relevamiento realizado en el noroeste de la provincia de Buenos Aires, por el contrario, los niveles más bajos se encontraron en otoño (19 ppm; Minatel et al., 1998). En zonas de cría vacuna, en la provincia de Corrientes, también se han hallado niveles marginales a bajos (15 a 28 ppm) en forrajeras naturales (Mufarрге et al., 1983).

Existen informes de que la suplementación con Zn en bovinos bajo sistemas pastoriles, donde los niveles del mineral son bajos o marginales, puede tener efectos sobre la ganancia de peso. Mayland et al. (1980), en un ensayo que duró 3 años consecutivos, halló una diferencia del 6 % en la ganancia de peso de los terneros al pie de la madre, cuando se suplementaron con ZnO oral, provisto en el suplemento proteico, a razón de 860 a 900 mg de Zn por cada par vaca-ternero. Los pastizales naturales del establecimiento, ubicado en Idaho, USA, con predominio de *Bromus tectorum*, contenían menos de 20 ppm (entre 7 y 17 ppm).

Perry et al. (1968) realizaron 4 ensayos de suplementación con Zn en novillos en terminación, en feedlot, utilizando ingredientes naturales que contenían entre 18 y 29 ppm de Zn. En dos de ellos se obtuvieron incrementos estadísticamente significativos en la ganancia de peso.

Otros investigadores, sin embargo, citan respuestas inconsistentes o nulas en referencia a este parámetro. De una serie de 7 experimentos de crecimiento en novillos en condiciones de estabulación, con dietas basales que contenían entre 16,7 y 20,9 ppm de Zn, Beeson et al. (1977) informaron diferencias estadísticamente significativas en la ganancia de peso debidas a la suplementación con Zn en sólo uno de ellos.

Al igual que en bovinos, en ovinos se han descripto efectos positivos de la suplementación con Zn. Egan (1972), en Australia, informó de un incremento en el porcentaje de parición del orden del 20 % en ovejas que pastoreaban praderas con contenidos del mineral entre 16 y 29 ppm. Resultados similares hallaron Masters y Fels (1980), también en Australia, en ovejas sobre pasturas que contenían niveles tan bajos de Zn como 13 ppm, incrementándose, además, el peso de los corderos al destete en 2,1 kg. Sin embargo, la suplementación con 25 ppm a partir de ZnO o de metionina-Zn en una dieta alta en grano de maíz que contenía 27,6 ppm de Zn, no mejoró la ganancia diaria de peso (GDP) en corderos, ni los niveles de Zn y FA en suero, así como tampoco los parámetros inmunitarios medidos (Droke et al., 1998).

La suplementación con Zn mejoró los niveles plasmáticos del mineral y la GDP de ganado caprino alimentado con una dieta que contenía 22 ppm de Zn, pero sólo produjo pequeños aumentos estadísticamente no significativos en la producción de mohair (Puchala et al., 1999).

Graham et al. (1994) informaron que la suplementación con Zn, como metionina-Zn, disminuyó las pérdidas fetales por abortos espontáneos en vacas lecheras. Sin embargo, la diferencia entre el Zn sérico promedio en ambos grupos fue pequeña (0,92 vs 0,89 µg/ml).

Las enfermedades podales en bovinos de carne y de leche responden a múltiples factores (climáticos, de manejo, infecciosos, dietarios). Uno de los más importantes factores dietarios tiene que ver con los niveles Zn en la dieta y la biodisponibilidad de este mineral. Ya en 1964, Bostico y Bonomi, en Italia, postulaban la relación entre el contenido de Zn de las pasturas y la susceptibilidad al pietín. Los autores encontraron que el Zn suplementario tenía un buen efecto profiláctico frente a la enfermedad, concluyendo que los pastos que contienen menos de 50 ppm de Zn deben considerarse deficientes y capaces de incrementar la susceptibilidad de los bovinos al pietín. Demertzis y Mills (1973), en Escocia, señalaron el éxito de una terapia con sulfato de ZnSO₄ oral para controlar dos brotes de dermatitis interdigital infecciosa en toros jóvenes de raza Frisona. Las dietas que recibían los animales contenían 30 a 35 ppm de Zn en el ensayo 1 y entre 48 y 56 ppm en el ensayo 2.

Voelker et al. (1969), utilizando raciones basadas en silaje de maíz, bajo en Zn, y concentrado, encontraron respuestas en producción de leche cuando suplementaron con ZnO. Kincaid et al. (1984) encontraron respuestas en producción de leche y conteo de células somáticas tanto con ZnO como con metionina-Zn.

En un ensayo realizado en nuestro país (Corbellini et al., 1997) la suplementación con metionina-Zn (2 g/vaca/día) redujo significativamente la incidencia de enfermedades podales en vacas lecheras, con un efecto menor y no significativo debido a la suplementación con ZnO. El uso de metionina-Zn incrementó un 5,4 % la producción de leche y redujo el porcentaje de partos distócicos, la prevalencia de endometritis, el intervalo parto-concepción y el recuento de células somáticas en leche. La dieta promedio que consumieron las vacas del grupo Control durante la lactancia contenía 25,9 ppm de Zn.

Hay consenso, en la actualidad, en torno a que, en la mayoría de los casos, con las dietas comúnmente usadas, resulta positiva la suplementación con Zn en vacas de alta producción.

En la experiencia de nuestro grupo de investigación, y a través de trabajos realizados en las provincias de La Pampa y Buenos Aires (Pechin et al., datos no publicados), la suplementación con ZnO oral o metionina-Zn inyectable disminuyó sustancialmente la incidencia de afecciones podales, tanto en bovinos de carne como en bovinos lecheros. Las afecciones podales que se presentaron fueron caracterizadas como dermatitis interdigital, según la clasificación moderna (Pesce et al., 1992; Greenough y Weaver, 1997). Sin embargo, en un ensayo realizado posteriormente (Pechin et al., 2001), a pesar de que la suplementación con ZnO incrementó los niveles de Zn en plasma y pelo, no disminuyó la incidencia de dermatitis interdigital (10,5 % en el grupo control vs. 11,5 % en el grupo suplementado), ni modificó la concentración de Zn en piel y cartílago costal. En dicho trabajo, la concentración de Zn en forrajes fluctuó entre 22 y 27 ppm.

Los resultados de la suplementación con Zn en ovinos con el objeto de prevenir la dermatitis interdigital también aparecen como contradictorios. Cross y Parker (1981) informaron que el uso de ZnSO₄ oral previno esta afección en épocas secas del año, pero no en las lluviosas, y sólo cuando los niveles de Zn en pastos eran bajos.

Los resultados dispares de la suplementación con Zn en este tipo de enfermedades podales refuerzan la idea de que su etiología es multifactorial, pero también señalan que en algunos casos es positiva la suplementación con Zn. Resta aclarar cuál es el rol exacto del Zn, aún cuando existe una relación lógica relacionada con el mantenimiento de la integridad de los epitelios queratinizados o la optimización del sistema inmunitario.

En otro aspecto de la interacción Fe-Zn, además de lo señalado a nivel abortivo, se demostró que la suplementación con Zn redujo la incidencia de retención placentaria y edema de ubre en vacas lecheras alimentadas con dietas altas en Fe (Miller et al., 1996). Se postula que el Zn puede ejercer un efecto protector frente a los cambios oxidativos inducidos por las altas dosis de Fe.

Toxicidad

El Zn es un mineral de muy baja toxicidad para aves y mamíferos, y con dietas comunes el tema no reviste ninguna importancia práctica. Los casos que ocurrieron naturalmente provienen de contaminaciones industriales o de errores muy groseros de formulación, y la vía de entrada es el alimento, el agua y, más raramente, la contaminación del aire. El máximo nivel tolerable fijado por el NRC (2005) es de 500 ppm para bovinos, 300 ppm para ovinos, 500 ppm de Zn para aves y 1.000 ppm para cerdos. Niveles de 700 o 900 ppm han reducido la ganancia de peso en terneros (Ott et al., 1966; Jenkins e Hidioglou, 1991) y producido una acumulación de Zn en algunos órganos, como hígado y páncreas. En un experimento se encontró que las vacas lecheras soportan niveles mayores aún, de 1.000 ppm, sin disminuir su producción (Miller et al., 1989). Altos niveles de Zn en la dieta pueden interferir con la absorción y el metabolismo de algunos minerales, como el Cu y el Fe, y agravar una deficiencia marginal de los mismos (McDowell, 1992) o llevar a una deficiencia secundaria de Cu (Sandstead, 1995).

Un consumo excesivo de Zn característico de una intoxicación aguda actúa como irritante local de los tejidos y causa malestar gastrointestinal, náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea. Las altas concentraciones lumbales pueden dañar la membrana del borde en cepillo del intestino delgado y permiten que el Zn entre a las células y se ligue no específicamente a proteínas celulares y otros ligandos (NRC, 2005).

La intoxicación crónica difiere de la de otros minerales, ya que el Zn no es carcinogénico, mutagénico o teratogénico, y algunos efectos pueden estar mediados por la interferencia en la absorción de algunos minerales, en especial el Cu, a juzgar por los trabajos con ovejas preñadas (Campbell y Mills, 1979) y con ratas (L'Abbe y Fischer, 1984). Además, el Zn en exceso puede causar acumulación en páncreas y disfunción de este órgano, reducción de algunos indicadores de la función inmunitaria (estimulación linfocitaria por hemaglutinina), falla renal y anorexia (Graham et al., 1988; NRC, 2005).

El tipo y severidad de los efectos adversos están relacionados al nivel y duración de la exposición, a la edad, al sexo, a la especie, al status nutricional y a la composición de la dieta. En general, los animales más jóvenes y las hembras reproductoras son más vulnerables. Los ruminantes parecen ser más susceptibles que los monogástricos, debido a los efectos de altas cantidades de Zn sobre los microorganismos ruminales. La forma química del Zn administrado influye en sus efectos tóxicos. En general, se halló que el ZnSO₄, por su mayor solubilidad y rapidez de absorción, es más tóxico que el ZnO (NRC, 2005)

El Zn en altas dosis ha sido utilizado por su efecto protector en la intoxicación con Cu en ovinos (Bremner et al., 1976), el eczema facial (intoxicación con esporidesmina), también en ovinos (Smith et al., 1977), y la prevención de la diarrea en el destete precoz de lechones (Poulsen, 1995), y estas prácticas pueden llevar a incrementar el riesgo de intoxicación con Zn.

Evaluación del status de zinc y diagnóstico de la deficiencia

En animales de interés zootécnico el diagnóstico de una deficiencia de Zn es fácil de realizar cuando los signos clínicos han aparecido, pero esto indica también que se ha perdido tiempo y dinero. Precisamente, desde el punto de vista productivo, es necesario detectar cuándo los animales están en riesgo de ser deficientes o cuándo presentan deficiencias marginales o leves. Al momento de seleccionar algún fluido o tejido para su análisis deben tenerse en cuenta el tamaño del pool de Zn a ser medido y su tasa de recambio, los factores que regulan la homeostasis de ese pool de Zn, la susceptibilidad específica del compartimento frente a la deficiencia (o el exceso) de Zn, la posibilidad de que se vea afectado por otras alteraciones fisiopatológicas y, finalmente, el costo de la determinación y las posibilidades prácticas de realizarla.

Underwood (1981) señala que, a medida que la deficiencia progresa, el Zn declina más marcadamente en páncreas, pelo y órganos sexuales. Además de los nombrados, en deficiencias severas se han hallado concentraciones bajas de Zn en hueso, hígado y piel (Miller y Miller, 1962; Miller et al., 1966). Sin embargo, la piel no parece ser siempre un tejido sensible a los cambios de Zn dietario (Miller et al., 1965b).

La concentración de Zn en suero o plasma es el indicador de deficiencia más ampliamente usado, pero su especificidad y su sensibilidad han sido cuestionadas cuando se consideran con criterio diagnóstico. Como se observa en la Tabla I.2, el Zn plasmático representa, paradójicamente, el pool corporal más pequeño, pero también es la fuente a la que rápidamente pueden hechar mano los tejidos para cubrir sus necesidades del mineral y posee una alta tasa de recambio.

El Zn en suero presenta valores similares al Zn plasmático. Idealmente, la muestra debe ser obtenida de sangre venosa y en un momento estandarizado del día, ya que la concentración de Zn sérico puede aumentar luego de una comida o luego de un ayuno (Aggett y Favier, 1993), aunque estas observaciones provienen de estudios con monogástricos. Cuando se trabaja con plasma (se aconseja usar heparina como anticoagulante) o suero es necesario no demorar su extracción una vez tomada la muestra de sangre. Debe evitarse la hemólisis y la contaminación de la muestra con tapones de goma u otras fuentes potenciales de Zn (Aggett y Favier, 1993).

Con respecto a la sensibilidad, la concentración de Zn en plasma, así como también en hueso, hígado y páncreas, disminuyen en la deficiencia de Zn antes de que se hagan evidentes la reducción en el crecimiento, la falla en el apetito y otras indicaciones de la deficiencia, pero las modificaciones a menudo son de escasa magnitud, a menos de que se trate de una deficiencia muy severa, lo que indica la tremenda importancia de los mecanismos homeostáticos. En un trabajo realizado por White et al. (1994) con ovinos el Zn plasmático resultó un indicador mucho más sensible ante aumentos progresivos de Zn en la dieta que otros parámetros, como la ganancia de peso.

La falta de especificidad del Zn plasmático como estimador del status de Zn se debe a que aquel puede disminuir frente a una variedad de situaciones estresantes: ejercicio, infección, enfermedad crónica, altas temperaturas, etc. (Mills, 1978; Cousins, 1985; Orr et al., 1990) y complicar la interpretación de los datos. Por otro lado, en situaciones de desnutrición, el catabolismo de algunos tejidos, como músculo y hueso, que representan los mayores pools de Zn, puede ayudar a mantener los niveles de Zn plasmático (Aggett y Favier, 1993).

Para soslayar el problema de algún factor estresante intercurrente, King (1990) propone la medición en forma conjunta del Zn y la MT plasmáticos. La concentración de MT en plasma refleja la concentración de MT hepática y, por lo tanto, ambas bajan en la deficiencia de Zn. Se ha demostrado que ambas MTs aumentan en respuesta al estrés, a la par que disminuye el Zn plasmático. Así, bajos niveles de Zn y MT en plasma implican una reducción en el pool de Zn intercambiable en respuesta a bajos consumos de Zn. Un bajo nivel de Zn plasmático, junto con altas concentraciones de MT, puede indicar que el Zn tisular está siendo redistribuido en respuesta a un factor estresante. Con respecto a la tercera posibilidad, si estuvieran presentes una deficiencia de Zn y estrés, los niveles de Zn y MT en plasma serán bajos, ya que la síntesis de MT hepática no es estimulada por el estrés en animales deficientes en Zn. Aún cuando estas conclusiones parten de trabajos realizados en humanos y ratas, y el costo de la medición de la MT plasmática es todavía alto, la técnica aparece como promisoría en rumiantes.

Kirchgeßner et al. (1993) proponen que la concentración de Zn en leche puede ser un buen indicador ya que va aumentando a medida que aumenta el Zn en dieta, hasta alcanzar una meseta alrededor de 6 µg/ml cuando se llega a un nivel de 40 ppm de Zn en el alimento. Esta meseta se extendería hasta que son sobrepasados los mecanismos homeostáticos, momento en que el Zn en leche comienza a aumentar nuevamente (Miller et al., 1965a). Sin embargo, el valor al cual se alcanza esa meseta es discutible, ya que Miller et al. (1965a) hallaron valores de 4,2 µg/ml en leche con una concentración dietaria de 44 ppm de Zn. De esta manera, el nivel de Zn en leche no aparece como concluyente, tomado aisladamente, y debería considerarse en conjunto con otras mediciones en el caso de bovinos lecheros, como Zn en suero y alimento.

El Zn en hígado puede ser utilizado con fines diagnósticos, aunque presenta las limitaciones prácticas propias de una biopsia hepática.

Se han identificado varias metaloenzimas Zn dependientes, pero la mayoría de ellas cambia sólo ligeramente en una deficiencia de Zn (Baker y Ammerman, 1995). Sin embargo, la FA sérica disminuye notablemente en la deficiencia de Zn (Miller et al., 1965b) y, a juzgar por los resultados de Spears (1989) en bovinos, parece comportarse mejor que el Zn plasmático. La actividad de esta enzima decae en respuesta a la deficiencia de Zn, pero en condiciones prácticas está sujeta a importantes fluctuaciones e influencias distintas a las del status de Zn, de manera que es difícil establecer rangos razonables que respondan a una adecuada provisión de Zn (Kirchgeßner et al., 1993).

Kirchgeßner et al. (1993) han propuesto una técnica para medir la respuesta del Zn y la FA plasmáticos, tres días después de la administración oral o inyectable de Zn. Esta técnica demostró ser útil, al menos en ratas, para detectar distintos grados de deficiencia de Zn.

Los análisis de Zn en pelo pueden ser utilizados para detectar deficiencias crónicas, a causa de su baja dinámica, y sólo después de eliminar cualquier tipo de contaminación externa (Mills, 1978). A pesar de que el pelo es una muestra fácil de tomar, presenta algunas variaciones que es preciso considerar (Miller et al., 1965c; Combs, 1987), y no siempre refleja

fielmente los niveles dietarios de Zn, a juzgar por los trabajos de Beeson et al. (1977). Carcagno et al. (1993), en nuestro país, trabajando con bovinos sanos y con adecuado ritmo de crecimiento, encontraron valores de $120,6 \pm 23,61$ ppm de Zn en pelo y de $1,13 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$ de Zn en plasma.

Un excelente criterio práctico para confirmar el diagnóstico de la deficiencia de Zn es la respuesta al tratamiento, en referencia al consumo de alimento, crecimiento y problemas específicos relacionados con esta deficiencia (Miller, 1970; White, 1992).

Probablemente, en la actualidad, para detectar deficiencias marginales de Zn, lo más recomendable sea combinar el análisis de Zn en plasma y alimento. Los niveles normales de Zn en plasma en animales domésticos están entre 0,8 y 1,2 $\mu\text{g/ml}$, pero la variabilidad individual puede ser alta (Underwood, 1981). McDowell (1992) sostiene que, en rumiantes, los valores de Zn plasmático por debajo de 0,6 $\mu\text{g/ml}$ pueden considerarse deficientes, entre 0,6 y 0,8 como marginales y entre 0,8 y 1,2 $\mu\text{g/ml}$ como normales, pero que estas mediciones deberían combinarse con la determinación del Zn en forrajes. Parece razonable considerar, a partir del análisis de la bibliografía disponible hasta el momento, un rango para bovinos de carne y lecheros, de 20 a 30 y de 20 a 40 ppm de Zn en alimento, respectivamente, donde puede existir una deficiencia marginal, pero en el cual los resultados de la suplementación con el mineral son inciertos. Los niveles en el alimento por debajo de 20 ppm se consideran como netamente deficientes.

La concentración y actividad de la mayoría de las enzimas Zn-dependientes no han probado ser indicadores útiles de deficiencia de Zn. Debido a su alta afinidad por el Zn no son las primeras proteínas Zn-dependientes en perder el Zn cuando el Zn del medio extracelular comienza a disminuir (O'Dell, 2000).

La membrana plasmática está cerradamente asociada con el medio extracelular y, al menos en el caso de los GR, su contenido de Zn decrece durante la depleción de Zn y es rápidamente restaurado en la repleción. Estos cambios en el contenido de Zn de la membrana son evidentes aún cuando la concentración de Zn total del GR permanece sin cambios (Bettger y Taylor, 1986; Johanning y O'Dell, 1989).

Por otro lado, algunos marcadores bioquímicos han sido explorados modernamente. Por ejemplo, la relación ácido linoleico:dihomo- γ -linoleico demostró ser un marcador sensitivo, debido a la esencialidad del Zn para el funcionamiento de la Δ -6 desaturasa (Reed et al., 2014).

Productos disponibles para la suplementación con zinc

Para alcanzar una producción animal eficiente y mantener un normal estado de salud en los animales es necesario que los nutrientes minerales sean provistos en la dieta en cantidades adecuadas y en una forma que sea biológicamente utilizable. El tipo de suplementación con Zn recomendable es a través de la vía oral, mezclando los suplementos con la dieta completa o proveyendo los mismos en forma separada, en bateas, en el caso de una alimentación pastoril. El grado de biodisponibilidad de los minerales influye en los requerimientos dietarios y es importante, por lo tanto, conocer esa biodisponibilidad en los alimentos y suplementos minerales que se utilizan comúnmente en la alimentación de los animales.

Las fuentes inorgánicas más frecuentemente utilizadas para la suplementación con Zn son óxido, sulfato y, en menor medida, carbonato y cloruro de Zn. Analizando los trabajos

realizados con monogástricos, en una revisión efectuada por Baker y Ammerman (1995), los autores no observaron una tendencia clara acerca de cuál de las fuentes presenta mayor biodisponibilidad. Sin embargo, a partir de los trabajos más modernos en aves (Wedekind y Baker, 1990; Sandoval et al., 1997a) y cerdos (Hahn y Baker, 1993; Wedekind et al., 1994; Schell y Kornegay, 1996) surge que el $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o el $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, usados normalmente como estándares, son superiores al ZnO . Por otro lado, tal como lo demostraron Edwards y Baker (1999), el ZnO disponible comercialmente, a diferencia de lo que sucede con el ZnSO_4 , varía ampliamente en color, textura, contenido de Zn y biodisponibilidad del Zn, de manera que la calidad del producto es un aspecto a considerar en nutrición práctica.

Recientemente, la industria comenzó a ofrecer otra forma inorgánica de Zn (Cloruro tetrahídrico de Zn), además de las tradicionales. Basado en las concentraciones plasmáticas y tisulares de Zn, su biodisponibilidad ha demostrado ser superior al ZnO en cerdos (Zhang y Guo, 2007).

En rumiantes (bovinos y ovinos) la tendencia general parece ser: $\text{ZnSO}_4 > \text{ZnO} > \text{ZnCO}_3 > \text{ZnCl}$ (Baker y Ammerman, 1995), aunque la superioridad del sulfato sobre el óxido de Zn no ha sido fehacientemente demostrada en todos los ensayos (Kincaid, 1979; Sandoval et al., 1997b).

Hace relativamente poco tiempo, la industria comenzó a producir complejos orgánicos de distintos minerales, de los cuales los más utilizados son los proteínatos y aminoatos. Se ha sostenido que su impacto en nutrición animal surge del hecho de que poseen una mejor digestibilidad y, además, a que, una vez absorbidos determinados complejos aminoácido-mineral son transportados a tejidos o sistemas enzimáticos específicos (Vandergrift, 1992).

El complejo aminoácido-mineral es definido como el producto resultante a partir de la reacción de una sal soluble del metal en cuestión y un aminoácido. El complejo metionina-Zn es, al presente, el complejo aminoácido-Zn más utilizado en producción animal. Se trata de un compuesto soluble, químicamente estable, eléctricamente neutro y con un peso molecular de 378 daltons (Brown y Zeringue, 1994).

Los aminoatos metionina-Zn y, en menor medida, lisina-Zn, han sido los más estudiados. Swinkels et al. (1994) sostienen que no existen evidencias consistentes acerca de la mejor biodisponibilidad del Zn en ellos. Sin embargo, a juzgar por los trabajos realizados en los últimos 15 años, existen algunas diferencias entre especies y, tal vez, entre destinos productivos (carne o leche, por ejemplo).

En ovinos y bovinos en crecimiento, y utilizando como parámetros el crecimiento y los niveles plasmáticos de Zn y FA, no se encontraron diferencias entre el ZnO y la metionina-Zn (Spears, 1989). Sin embargo, cuando el mismo autor realizó ensayos de balance químico usando dietas semi-purificadas, el uso de la metionina-Zn resultó en una mayor retención que el ZnO , resultante de coeficientes de absorción aparente similares pero diferentes niveles de excreción urinaria (Spears, 1989). Rojas et al. (1995), informaron que la metionina-Zn presentó similar biodisponibilidad que el ZnO y el ZnSO_4 en corderos a juzgar por la concentración de Zn en determinados órganos, pero que la lisina-Zn fue superior a las demás fuentes probadas, logrando concentraciones de Zn superiores en páncreas, hígado y riñón. Kincaid et al. (1997) hallaron que metionina-Zn y lisina-Zn tienen mejor biodisponibilidad que ZnO en terneros, cuando se compararon los niveles de Zn en suero e hígado. Contrariamente a estos resultados, Kegley y Spears (1994) hallaron que la suplementación de corderos (alimentados con heno de festuca) con ZnO y ZnSO_4 mejoró la ganancia de peso y la conversión alimenticia, comparados con los grupos control y metionina-Zn. Nockels et al.

(1993) trabajaron con terneros a los que se les indujo estrés mediante la restricción de agua y la administración de adrenocorticotrofina. Ni durante el período de estrés ni durante el período de repleción, la retención aparente de Zn fue diferente entre $ZnSO_4$ y metionina-Zn. En rumiantes en crecimiento la información acerca del uso de metionina-Zn, hasta el presente, aparece como contradictoria y serían necesarios ensayos más ajustados para determinar su biodisponibilidad.

En el único trabajo realizado con vacas de cría, los animales suplementadas con metionina-Zn destetaron terneros más pesados y ganaron más peso que los suplementadas con ZnO (Spears y Kegley, 1991).

Sin embargo, el uso de metionina-Zn en vacas lecheras aparece como más promisorio, con respuestas que parecen explicadas por su mayor biodisponibilidad. Los primeros trabajos de Kincaid et al. (1984) ya señalaban que las respuestas en producción de leche y disminución en el número de células somáticas en leche eran mejores para metionina-Zn que para ZnO. Kellog (1990) revisó los resultados de 8 ensayos con 492 vacas lecheras comparando el uso de metionina-Zn con la suplementación con cantidades similares de Zn bajo la forma de ZnO. En estos ensayos, la suplementación con metionina-Zn incrementó la producción de leche en un 4,8 %, con una reducción significativa de la incidencia de afecciones podales. Similares hallazgos con respecto a la metionina-Zn fueron informados en nuestro país por Corbellini et al. (1997), como se citara anteriormente. Las respuestas observadas con ZnO fueron menores y no significativas, con la excepción de algunos parámetros reproductivos (vacas con partos distócicos y vacas con endometritis post-parto o al servicio), en los cuales no hubo diferencias entre las dos fuentes de Zn.

Spears et al. (1991) investigaron también los efectos de la cantidad y fuente de Zn sobre la respuesta inmune en terneros que consumían una dieta que contenía 26,4 ppm de Zn. Los animales suplementados con 25 ppm de Zn en forma de metionina-Zn mostraron mayores títulos de anticuerpos cuando fueron inmunizados contra el virus de la rinotraqueítis infecciosa (IBR), mientras que los suplementados con igual cantidad de Zn en forma de ZnO mostraron títulos intermedios.

Los terneros suplementados con Zn y Mn, y desafiados posteriormente con virus IBR, perdieron menos peso y presentaron una menor disminución del Zn plasmático que los controles a los 7 días post-desafío. Sin embargo, la respuesta fue similar entre los animales alimentados con fuentes inorgánicas (ZnO y MnO) y orgánicas (metionina-Zn y metionina-Mn; Chirase et al., 1994). Un ensayo realizado recientemente por Kegley y Spears (1995) en corderos tampoco permite establecer una superioridad de la metionina-Zn sobre el ZnO en la respuesta inmune.

El glicinato de Zn es una fuente menos difundida que la metionina-Zn. Cuando fue comparada con $ZnSO_4$ en ratas (Schlegel y Windisch, 2006), resultó en una mejor absorción verdadera de Zn (51 vs 44 %) y en una mejor retención de Zn (33 vs 25 %). En otro ensayo, sin embargo, el glicinato de Zn obtuvo resultados similares al sulfato de Zn, tanto en pollos como en lechones (Schlegel et al., 2010). Hasta el momento, no existen ensayos en rumiantes con glicinato de Zn.

Spears et al. (2004) compararon $ZnSO_4$, metionina-Zn y glicinato de Zn, adicionados a razón de 20 ppm a una dieta alta en forrajes que contenía 18,8 ppm de Zn en novillos Angus. Las tres fuentes arrojaron similares resultados cuando se midieron absorción aparente y retención de Zn, y niveles de Zn y FA plasmáticos, pero el grupo adicionado con glicinato de Zn tuvo mayores concentraciones hepáticas de Zn.

Los complejos Zn-aminoácidos se presentan como una alternativa en la elección de compuestos orgánicos de Zn para alimentación animal. En general, su producción industrial es más económica, y los átomos de Zn se hallan unidos a varios aminoácidos, provenientes de la hidrólisis de distintas proteínas. Cuando un complejo Zn-aminoácidos (Availa Zn, Zinpro Corporation, USA) fue comparado con metionina-Zn, a las dosis de 30 ppm, los parámetros medidos en feedlot (ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y características de la carcasa) fueron similares (McBeth et al., 2002). La estabilidad del complejo Zn-aminoácidos fue evaluada en dos ensayos in vitro con fluido ruminal (Anónimo, 2001a y 2001b), hallándose que alrededor del 94 % del complejo era recuperado luego de una incubación de 24 horas. En un ensayo realizado recientemente (Siciliano-Jones et al., 2008), el reemplazo de Zn, Cu, Mn y Co en la forma de sulfatos por un complejo con aminoácidos y dichos minerales en la dieta desde las 3 semanas preparto hasta las 35 semanas postparto disminuyó la incidencia de úlcera solar y tendió a disminuir la incidencia de dermatitis interdigital en vacas lecheras. Las vacas suplementadas con minerales orgánicos produjeron más proteína y sólidos (grasa + proteína). La dosis suplementaria de Zn utilizada en este caso fue de 360 mg/día.

En un ensayo realizado en ovejas, Hatfield et al. (2001) hallaron pequeños incrementos en los niveles de Zn hepático, como resultado de la alimentación con un complejo Zn-aminoácidos en lugar de $ZnSO_4$, pero la tendencia en la concentración de FA sérica sugirió lo contrario. Cao et al. (2000) compararon la biodisponibilidad relativa (BDR) del Zn en varias fuentes orgánicas en relación al $ZnSO_4$ en pollos y corderos. A excepción de un complejo Zn-proteinato, las demás fuentes (Zn-lisina, Zn-metionina, Zn-aminoácidos y Zn-polisacáridos) tuvieron una BDR similar a la fuente patrón.

Dozier et al. (2003) no encontraron diferencias en parámetros productivos cuando compararon $ZnSO_4$ y Zn-aminoácidos en pollos parrilleros. En el trabajo de Burrell et al. (2004) la única diferencia significativa entre ambas fuentes fue que la excreción acumulativa de Zn por heces era menor con Zn-aminoácidos que con $ZnSO_4$.

Swinkels et al. (1996) no hallaron diferencias entre $ZnSO_4$ y un quelato de Zn-aminoácidos en lechones, al comparar las concentraciones séricas y tisulares de Zn (hígado, riñón y páncreas). Payne et al. (2006) compararon $ZnSO_4$ y Zn-aminoácidos en la alimentación de cerdas y lechones destetados. Los parámetros de acumulación tisular (hueso, hígado y páncreas) en las cerdas fueron similares en ambas fuentes, mientras que en lechones, la concentración hepática de Zn fue mayor en el grupo $ZnSO_4$. Por el contrario, el número de lechones nacidos y destetados fue superior en las cerdas alimentadas con Zn-aminoácidos.

Wright y Spears (2004) estudiaron los efectos de la adición de 20 ppm de Zn a partir de proteinato de Zn o $ZnSO_4$, a una dieta que contenía 28 ppm de Zn, en terneros Holstein. El grupo suplementado con $ZnSO_4$ tuvo mayores niveles de Zn hepático, pero ninguno de los tratamientos modificó la concentración de Zn y FA en plasma. Sólo cuando se utilizaron ambas fuentes a niveles supranutricionales (500 ppm), los niveles de Zn en plasma y tejidos fue superior en el grupo suplementado con proteinato de Zn.

La adición de 25 ppm de Zn a partir de proteinato de Zn mejoró algunas características de la carcasa en novillos cuando se comparó con igual cantidad de ZnO, mientras que la GDP y la conversión alimenticia tendieron a ser mejores también con la fuente orgánica (Spears y Kegley, 2002).

Comentarios finales

Si bien son raros los hallazgos de casos de deficiencia clínica de Zn en rumiantes, actualmente se reconoce que la deficiencia subclínica de Zn podría constituir una limitante nutricional, especialmente en sistemas basados en animales de altos niveles de producción. Durante décadas, se han utilizado sales inorgánicas, como ZnO o ZnSO₄, para la suplementación de las dietas. Actualmente, se abre un nuevo campo de investigación en torno al empleo de sales orgánicas de Zn, especialmente metionina-Zn y complejos Zn-aminoácidos, a juzgar por resultados que permiten suponer que estos compuestos poseen una mayor biodisponibilidad.

Capítulo II. Desarrollo de un modelo de deficiencia subclínica de zinc en ovinos

Introducción

El trabajo pionero de Todd et al. (1934) demostró que el Zn es un mineral esencial para las ratas, pero hubo que esperar dos décadas para que se reconociera su importancia en animales de interés productivo (Tucker y Salmon, 1955). A partir de allí, el Zn ha ocupado un lugar destacado en la investigación referida a nutrición y salud de animales y seres humanos.

La deficiencia de Zn ha sido producida en bovinos, bajo situaciones experimentales y utilizando dietas semisintéticas (Miller y Miller, 1960; Miller y Miller, 1962; Miller et al., 1965a; Ott et al., 1965a). La deficiencia experimental de Zn fue descrita por primera vez en ovinos por Ott et al. (1964) y en caprinos por Miller et al. (1964). También ha sido reproducida en muchas especies de monogástricos: cerdos (Luecke et al., 1956; Miller et al., 1968), pollos (O'Dell et al., 1958), conejos (Apgar, 1971; Joseph et al., 1981), ratones (Beach et al., 1980), perros (Sanecki et al., 1985), monos (Barney et al., 1967) y gatos (Kane et al., 1981).

El Zn cumple un importante rol en el organismo como parte integral de más de 200 metaloenzimas, entre las que se citan: anhidrasa carbónica, glutámico deshidrogenasa, D-gliceraldehído 3-fosfo deshidrogenasa, alfa-manosidasa, fructosa 1-6 difosfatasa, alcohol deshidrogenasa, FA, carboxipeptidasa, aminolevulínico deshidratasa, retineno reductasa, ADN y ARN polimerasas, timidina quinasa, Cu-Zn superóxido dismutasa (Miller, 1970; Underwood y Suttle, 1999, McCall et al., 2000). Se reconoce, además, su papel como antioxidante (Powell, 2000), en la estabilidad de la membrana plasmática (O'Dell, 2000) y en la regulación de la expresión génica (Cousins, 1994; Cousins et al., 2003). De allí su vital papel en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los ácidos nucleicos, en la división celular, la reproducción, el funcionamiento del sistema inmunológico, el control de los radicales libres, etc.

Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de Zn en todas las especies animales son: anorexia, retraso en el crecimiento, anormalidades de la piel y sus apéndices, desórdenes esqueléticos y reproductivos (Underwood y Suttle, 1999).

Las lesiones características de la deficiencia de Zn en la piel son paraqueratosis y dermatitis, visibles en distintos sectores del cuerpo, pero especialmente en extremidades, morro, orejas y alrededor de los ojos (Ott et al., 1965a; Blackmon et al., 1967). En epitelios del aparato digestivo, por ejemplo boca, lengua y, más marcadamente, en esófago se ha descrito un incremento en el número de capas celulares y queratinización anormal (Follis et al., 1941; Miller y Miller, 1960; Whitenack et al., 1978).

A nivel óseo, Norrdin et al. (1973), Suwarnasan et al. (1982) y Rossi et al. (2001) han informado estrechamiento de la placa epifisaria, distorsión en las columnas de condrocitos y disminución del crecimiento del hueso endocondral y periostial. En un trabajo con pollos alimentados con una dieta que poseía 10 ppm de Zn, y que no produjo disminución del consumo ni de la ganancia de peso (Wang et al., 2002b), se observó disrupción de la estructura columnar de los condrocitos en la placa de crecimiento, inhibición de su proliferación e inducción de apoptosis, especialmente en áreas más alejadas de los vasos sanguíneos. Demostrando un efecto directo de la deficiencia de Zn, a los 7 días de haber

comenzado con la dieta experimental, los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), proteína relacionada a la parathormona (PTHrP) y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) estaban grandemente reducidos en las zonas de lesión.

En modelos de deficiencia clínica de Zn se ha encontrado disminución en el número de linfocitos en timo, linfonódulos y bazo (Sannecki et al., 1985), atrofia de las glándulas salivales, con presencia de acinos poco delimitados (Vanderlei et al., 1995) y cambios ultraestructurales muy notorios en células acinares pancreáticas (Koo y Turk, 1977).

La atrofia y degeneración de los túbulos seminíferos, con escasa o nula producción de espermatozoides es un hallazgo común en deficiencias severas de Zn en ratas (Barney et al., 1968; Mason et al., 1982). En carneros jóvenes alimentados con dietas que contenían 2,4 ppm de Zn se produjo una reducción importante del crecimiento testicular y una cesación de la espermatogénesis (Underwood y Somers, 1969). Sin embargo, ambos parámetros fueron mayores en los animales que recibían 32,4 ppm que en los que consumían una dieta con 17,4 ppm de Zn, a pesar de que su ganancia de peso fue similar, lo que sugiere que los requerimientos para maximizar la función reproductiva pueden ser superiores que los necesarios para el crecimiento de los animales.

La disminución del crecimiento causada por la deficiencia de Zn es debida, fundamentalmente, a un menor consumo de alimento, aunque se observó que la ganancia de peso era aún menor en los animales deficientes que en el grupo pareado por consumo, lo que indica una menor eficiencia de conversión alimenticia (Miller et al., 1965, en bovinos; Miller et al., 1968, en cerdos). En relación a este problema, Sommers y Underwood (1969) hallaron una menor retención de N en los corderos deficientes en comparación con los controles pareados por consumo, causada por una similar digestibilidad de la proteína pero una mayor excreción urinaria N, lo que indica una disminución en la síntesis de proteína, un incremento en el catabolismo proteico o ambas a la vez.

La concentración de Zn en suero o plasma es el indicador de deficiencia más ampliamente usado, pero su especificidad y sensibilidad han sido criticadas cuando se considera con criterio diagnóstico. Los niveles normales en animales domésticos están entre 0,8 y 1,2 µg/ml, pero la variabilidad individual puede ser alta y otros factores, además de los niveles de Zn dietario, afectan las concentraciones de Zn sérico (Underwood y Suttle, 1999), por ejemplo, la edad o las demandas metabólicas. En referencia a esto, animales jóvenes de rápido crecimiento o vacas lactantes sufren rápidos cambios plasmáticos cuando consumen dietas bajas en Zn. El stress, las infecciones y las altas temperaturas pueden hacer declinar los valores de Zn en suero (Mills, 1978; Orr et al., 1990) y complicar la interpretación de los datos. En condiciones experimentales, por lo tanto, es necesario estandarizar el momento de muestreo y tratar de evitar factores de variación externos al ensayo. McDowell (1992) señala que, en rumiantes, valores de Zn plasmático por debajo de 0,6 µg/ml pueden considerarse deficientes, entre 0,6 y 0,8 como marginales y entre 0,8 y 1,2 µg/ml como normales. Suttle (2010) sitúa la “banda marginal” de deficiencia en rumiantes entre 0,4 y 0,6 µg/ml y sugiere que valores medios de una muestra poblacional por debajo de este rango (acompañados por otros criterios, por ejemplo, Zn en alimentos o en hueso) indican un probable beneficio de la suplementación con Zn en suficientes animales como para ameritar la intervención. Los valores dentro de la banda marginal, según estos autores, indican la posibilidad de futuros beneficios si el status de Zn no mejora.

Se han identificado varias metaloenzimas Zn dependientes, pero la sensibilidad frente a una deficiencia de Zn puede ser baja en muchas de ellas (Baker y Ammerman, 1995). La FA

sérica ha sido la enzima Zn dependiente más estudiada y se ha comprobado que disminuye notablemente en la deficiencia de Zn, a un nivel comparable al del Zn sérico, tanto en monogástricos (Miller et al., 1968; Adeniyi y Heaton, 1980) como en rumiantes (Miller et al., 1965a). La falta de especificidad achacada a esta enzima se debe a que está sujeta a factores diferentes a los del status de Zn (como afecciones óseas o intestinales), de manera que es difícil establecer rangos de normalidad razonables (Kirchgessner et al., 1993). De todas maneras, estos autores, a partir de ensayos realizados con ratas, sostienen que las respuestas de ambos parámetros, Zn sérico y actividad de FA en suero, son paralelas y relacionadas proporcionalmente al grado de deficiencia de Zn. Sólo en un ensayo, realizado con vaquillonas que consumían una dieta a base de silaje de maíz, con 23,1 ppm de Zn, se encontró una respuesta a la suplementación con 25 ppm de Zn sobre los niveles séricos de FA, pero no así en los niveles de Zn plasmático ni en la ganancia de peso (Spears, 1989).

La deficiencia clínica de Zn en ratas, en comparación con un grupo control pareado por consumo, ha producido una disminución significativa del Zn en plasma y en algunos órganos, como hueso, hígado, páncreas y riñón (Adeniyi y Heaton, 1980; Suwarnasan et al., 1982), y también en testículos (Mason et al., 1982), pero no en músculo, a pesar de ser el pool cuantitativamente más importante. En un trabajo realizado con conejos (Bentley y Grubb, 1991) se halló que una deficiencia severa de Zn (2 ppm) producía una disminución de la concentración del mineral en hígado y hueso, pero esto no sucedía con una deficiencia más moderada (7 ppm).

Miller et al. (1966) compararon una dieta deficiente (6 ppm de Zn) con otra que contenía 40 ppm de Zn en rumiantes, aunque sin un grupo pareado por consumo, y hallaron diferencias en pulmón, hígado, bazo, riñón, testículos y pelo, a pesar de que este último parece más adecuado para detectar deficiencias crónicas (Mills, 1978). A juzgar por el ensayo de White et al. (1994) en corderos, la concentración de Zn en lana es un indicador menos sensible que el Zn plasmático, ya que sólo difirió entre el grupo deficiente y el primer grupo suplementado (10 ppm de Zn en la dieta), mientras que el segundo indicador fue incrementándose a medida que aumentaba el Zn dietario, hasta 27 ppm.

La interacción Cu-Zn ha sido estudiada en monogástricos y rumiantes, ya que existen situaciones de alimentación práctica donde puede producirse, por ejemplo, en cerdos y en ovinos.

Van Campen (1969) demostró, utilizando la técnica de segmentos ligados de intestino en ratas, que el Cu instilado en el lumen intestinal disminuyó la absorción de Zn. Cuando se incrementó el nivel de Cu en la dieta de 3 a 24 ppm, la absorción de Zn descendió moderadamente (un 20 %), pero un posterior aumento a 300 ppm de Cu no produjo un efecto adicional (Hall et al., 1979). Sin embargo, debido a que el Cu es más tóxico que el Zn, la interacción Cu-Zn queda prácticamente restringida a aquellos casos en los que se añade CuSO_4 a las dietas de lechones destetados precozmente, con el propósito de disminuir la incidencia de diarreas.

La suplementación con Zn a niveles altos (entre 350 y 560 ppm) en ratas ha producido una disminución en indicadores del status de Cu, como por ejemplo Cu y ceruloplasmina en suero y Cu en hígado (Reeves et al., 1993; Reeves, 1998), y estos efectos parecen más significativos cuando los niveles de Cu en la dieta son bajos o marginales, entre 1,5 y 4 ppm, y no a concentraciones mayores, como 9 ppm (Reeves, 1995; Reeves y Rossow, 1996). Sin embargo, hay indicios de que 120 ppm de Zn provocan un descenso de algunas enzimas Cu dependientes en tejidos de ratas alimentadas con 6 ppm de Cu (L'Abbé y Fischer, 1984).

Los resultados con cerdos son contrastantes. Hill et al. (1983) informaron que la suplementación de una dieta a base de maíz-soja con niveles relativamente bajos (50 ppm de Zn), a partir de ZnO, disminuyó los depósitos de Cu hepático, pero no los niveles de Cu en suero, páncreas y músculo. Por otro lado, Cox y Hale (1962) hallaron que la adición de 1.000 y 2.000 ppm de Zn no disminuyeron la concentración de Cu hepático, en un ensayo que duró 69 días. En otro ensayo, la adición de 100 ppm de Zn disminuyó la acumulación hepática de Cu cuando se agregaron a la dieta 125 y 250 ppm de Cu, como CuSO_4 (Ritchie et al., 1963).

En rumiantes, los trabajos son más escasos. Campbell y Mills (1979) hallaron que la adición de 750 ppm de Zn induce una severa deficiencia de Cu en ovejas preñadas. En vacas lecheras, 1.000 ppm de Zn produjeron una disminución del Cu sérico, pero no del Cu en hígado en un ensayo que duró 14 semanas (Miller et al., 1989). La incorporación de niveles menores de Zn, entre 24 y 50 ppm, no parecen tener efectos significativos (Kegley y Spears, 1994; White et al., 1994).

Para realizar un ensayo de BDR, en el cual se comparan las respuestas a dosis crecientes de Zn a partir de una o más fuentes, con respecto a la respuesta producida por una fuente estándar (generalmente, sulfato de Zn), es necesario contar con un modelo de deficiencia de Zn. En este caso, se decidió trabajar con ovinos debido al menor consumo de alimento, ya que las dietas experimentales son costosas, y a que posibilita un mejor manejo en jaulas metabólicas.

En los ensayos de biodisponibilidad, es importante que la dieta base usada sea adecuada en los demás nutrientes para producir la respuesta deseada en el animal (Ammerman, 1995). Generalmente, se utilizan las recomendaciones del NRC (1996, 2001, 2007, 2012) para las distintas especies animales.

Cuando las concentraciones dietarias del mineral a ser probado son menores que el requerimiento, es importante que la fuente del elemento en cuestión represente la porción mayoritaria de la concentración dietaria total del elemento. En general, cuanto más alta es la proporción del elemento probado en la dieta basal, más sensitivo será el ensayo para medir la biodisponibilidad (Ammerman, 1995).

Además de utilizar animales con altas necesidades corporales de Zn, los niveles usados en la prueba deben ser cuidadosamente seleccionados. Si los niveles son muy bajos (en la dieta base), puede haber una depresión en el apetito de los animales. Por otro lado, si los niveles de Zn son muy altos, la repleción de los tejidos puede ocurrir muy rápidamente, o bien, en los ensayos de balance, puede no obtenerse una respuesta lineal ante el incremento progresivo en los niveles de Zn en la ración, por un incremento en la excreción endógena de Zn. Entonces, debería realizarse un experimento previo de dosis-respuesta para determinar los niveles óptimos de Zn. Dentro del rango óptimo, puede monitorearse el status de Zn de los animales, utilizando niveles de Zn, MT y enzimas Zn dependientes en suero, plasma o tejidos (Swinkels et al., 1994). Estos parámetros pueden ser determinados una o más veces, pudiendo utilizarse varios de ellos conjuntamente en un ensayo de biodisponibilidad (Wedekind y Baker, 1990).

Existe una serie de trabajos que han utilizado modelos de deficiencia clínica de Zn, tanto en monogástricos como en rumiantes. Panemangalore y Bebe (1997) han comentado todas las condiciones que deben reunir los ensayos para estudiar la deficiencia o exceso de Zn, con especial referencia a ratas (un modelo pensado para humanos, pero que puede extenderse a animales monogástricos). Se ha hecho especial hincapié en controlar la contaminación del alimento, usando alimentos purificados bajos en Zn, y del medio, utilizando jaulas de plástico o acero inoxidable.

La principal dificultad para desarrollar dietas semisintéticas para el estudio de elementos traza en rumiantes fue la selección de una fuente de proteína o N baja en oligoelementos, y especialmente en Zn. La urea grado alimentación (“feed grade”) es una fuente invariablemente baja en Zn (<1 ppm), mientras que la albúmina de huevo deshidratada en polvo es la fuente proteica de elección, ya que, aunque costosa, es consistentemente baja en Zn. Como fuentes de energía, en los ensayos se utilizó almidón de maíz y glucosa o sacarosa. La fuente de fibra plantea algún problema, también, ya que las fuentes de celulosa lignificada pueden poseer Zn y Cu (Mills, 1978).

En la Tabla II.1, se resume la composición de las dietas usadas por diferentes investigadores en rumiantes en crecimiento (corderos o terneros). Los niveles de Zn variaron entre 1,5 y 3,9 ppm.

Tabla II.1. Dietas experimentales utilizadas en el estudio de la deficiencia de Zn en rumiantes

Ingrediente	% ¹ (rumiantes) ^a	% (corderos) ^b	% (corderos) ^c	% (corderos) ^d	% (corderos) ^e
Albúmina de huevo	6	11	7,5	7,5	15
Urea	3	1,5	2	2	-
Almidón	42	34,4	25	35	27,02
Glucosa	32	25	-	-	27,02
Sacarosa	-	-	15	10	-
Aceite de maní	3	-	-	-	-
Cáscara de algodón	9	20	-	-	-
Celulosa	-	-	-	-	20
Paja de cereal ²	-	-	40 ³	39	-
Núcleo min.-vitam.	5	5,1	8,5	6,5	7,96
Aceite de maíz	-	3	-	-	3
Aceite de soja	-	-	2	-	-

¹ composición porcentual (base MS). ² trigo o cebada. ³ tratada con álcali.

^a Mills, 1978. ^b Spears, 1989. ^c White et al., 1994.

^d Underwood y Somers, 1969 ^e Ott et al., 1964.

Hipótesis

A partir del desarrollo de un modelo de deficiencia de Zn en rumiantes es posible hallar diferentes variables que respondan consistentemente a la misma, de manera que permitan la realización de ensayos de biodisponibilidad relativa.

Objetivos

El objetivo general del presente trabajo fue desarrollar un modelo de deficiencia de Zn en ovinos, que permita posteriormente realizar un ensayo de biodisponibilidad relativa.

Los objetivos particulares incluyeron verificar el efecto de la deficiencia subclínica de Zn sobre: ganancia de peso, producción y calidad de la lana, y parámetros bioquímicos,

hematológicos, histológicos y de concentración tisular relacionados con el metabolismo del Zn y del Cu.

Materiales y Métodos

Diez corderos de raza Corriedale, con un peso de $10,09 \pm 1,285$ kg, fueron asignados en forma aleatoria, estratificando por peso inicial, a dos grupos: Basal (B) y Suplementado con Zn (Z). Ambos grupos recibieron una dieta a base de paja de trigo, almidón de maíz, sacarosa, albúmina de huevo deshidratada, aceite de girasol, urea y núcleo mineral-vitamínico. Esta dieta fue similar a la utilizada en su ensayo por White et al. (1994), con algunas modificaciones: se disminuyó el contenido de paja de trigo, se incrementó el de albúmina de huevo y se suplantó el aceite de soja por el de girasol. Luego de comprobarse una importante incidencia de acidosis, se agregó 3 % de bicarbonato de sodio, lo cual ayudó a controlar sólo parcialmente el problema.

Tabla II.2. Dieta experimental (composición porcentual, base alimento como tal).

Ingrediente	Porcentaje
Albúmina de huevo deshidratada	10
Urea	2
Almidón de maíz	34,8
Sacarosa	14
Paja de trigo	30
Núcleo mineral-vitamínico	4,2
Bicarbonato de sodio	3
Aceite de girasol	2

Tabla II.3. Composición del núcleo mineral-vitamínico (para un total de 42 g, contenidos en 1 kg de alimento).

Ingrediente	Cantidad
Cloruro de potasio (KCl)	11,5 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	7,0 g
Fosfato mono-bicálcico CaHPO ₄ .2H ₂ O - Ca (H ₂ PO ₄) ₂ .H ₂ O	14,3 g
Azufre (S)	2,0 g
Óxido de magnesio (MgO)	2,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	3,75 g
Óxido de manganeso (MnO)	40 mg
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .H ₂ O)	23 mg
Sulfato de cobalto (CoSO ₄)	0,8 mg
Iodato de calcio (Ca(IO ₃) ₂ .H ₂ O)	0,33 mg
Selenito de sodio (al 1 %) (Na ₂ SeO ₃)	44 mg
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .H ₂ O)	156 mg
Vitamina A	5.000 UI
Vitamina D ₃	1.000 UI
Vitamina E	50 UI

Dicha dieta fue preparada en el laboratorio, y se transportó hasta el galpón en recipientes plásticos tapados. El mezclado de la dieta se facilitó al moler la paja, lográndose fragmentos entre 0,5 y 2 cm de largo de la misma, los que cumplen los requerimientos mínimos para la “fibra efectiva” (tamaño de partícula que estimula la rumia y la salivación).

El alimento se administró dos veces al día, por la mañana y por la tarde, en forma restringida, a un nivel que fluctuó entre el 2,7 y el 3 % del peso de los animales. La dieta B contenía 10 ppm de Zn, base MS, y la dieta Z fue suplementada con ZnSO₄.H₂O, para aportar un nivel extra de 30 ppm de Zn.

Los corderos fueron alojados en jaulas de plástico, de 1 m x 0,5 m, con piso ranurado. Se procedió con un período de destete y acostumbramiento de dos semanas, durante las cuales los animales fueron alimentados con gramíneas (cebadilla, en su mayor parte), cortadas y ofrecidas en estado fresco. El ensayo tuvo una duración de 5 meses. Al inicio del ensayo, se esquiló un área de 80 cm², del flanco de cada cordero, con el objeto de medir el crecimiento y la calidad de la lana en ambos grupos. Los animales se pesaron mensualmente, para evaluar la evolución de la ganancia de peso. También mensualmente, fueron sangrados de vena yugular y se extrajeron dos muestras de sangre con distintos anticoagulantes (heparina y EDTA sódico). Las muestras obtenidas con heparina fueron centrifugadas a 2.000 rpm, durante 10 minutos, y el plasma sobrenadante se separó en dos submuestras. Una submuestra se utilizó para la posterior medición de los niveles de Zn y Cu. En la segunda submuestra de plasma se midió la actividad de FA. Las muestras de sangre obtenidas con EDTA sódico como anticoagulante se utilizaron para realizar el conteo de glóbulos rojos, leucocitos y linfocitos, la medición del hematocrito y la determinación de la concentración de hemoglobina. Los parámetros hematológicos fueron medidos a partir del segundo mes del ensayo. A los 45 días y durante la última semana del trabajo se realizaron sendos ensayos de balance de Zn, de Cu y

de N. Durante cada período de balance (5 días) se midió el alimento consumido por cada animal y la producción de heces y de orina, las que se recogieron diariamente. Se tomó una alícuota diaria de cada excreta (30 gr para heces y 20 ml para orina), y se guardaron a - 20 °C hasta su análisis. A partir de estos datos, se calculó la cantidad de Zn, Cu y N retenidos diariamente por cada animal.

Al finalizar el ensayo, se cortó la lana de las áreas previamente delimitadas y se pesó para medir la producción de lana durante el período. Una muestra de cada animal fue enviada al laboratorio para la medición de las concentraciones de Zn y Cu por EAA (en ppm, base MS). Otra muestra fue procesada para determinar los parámetros de calidad en el Laboratorio de Calidad de Lanas de INTA Bariloche: diámetro de lana (analizador Sirolan-Laserscan, método IWTO-12-00; IWTO, 2001), curvatura de lana (analizador Sirolan-Laserscan; Dabbs et al., 1994) y resistencia a la tracción (método IWTO-30-98; IWTO, 2002).

Cuando culminó el ensayo, se procedió al sacrificio de los animales por exanguinación. Luego del mismo, se recogieron muestras de músculo (longissimus dorsi, supraescapular y semimembranoso), hígado, páncreas, testículo, riñón, pulmón y hueso (metacarpo y metatarso) para la determinación de los niveles de Zn y Cu. Por otro lado, también se tomaron muestras de piel (zonas del flanco y del vientre), hueso (metacarpo y metatarso, tercios distales), testículo, páncreas y del epitelio de lengua (zona dorsal media), esófago, rumen y vejiga para ser procesadas en el Laboratorio de Histopatología con las técnicas de rutina (fijación, inclusión con parafina, tinción con hematoxilina-eosina). Las muestras de hueso metacarpiano y metatarsiano (epífisis distal) fueron descalcificadas utilizando una solución al 10% de ácido fórmico bufferado a pH 4,5 con citrato de sodio. Luego de la inclusión en parafina y el corte en secciones de 6 micras de ancho, se realizó la tinción con hematoxilina-eosina. En huesos metacarpiano y metatarsiano se realizó histomorfometría en la región del cartílago de crecimiento distal y zonas adyacentes. Las fotografías se obtuvieron con una cámara de video adosada a un microscopio óptico (aumento 100 X) y fueron procesadas mediante el programa Scion Image (Scion Corporation, Maryland, USA).

Las determinaciones de Zn y Cu fueron realizadas por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA), utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 5100 PC (Perkin Elmer, 1996), por medio de las técnicas de Allan (1961) y de Piper y Higgins (1967). Los resultados se expresaron en ppm, base MS, en el caso de los sólidos y en µg/ml en el caso de los líquidos.

Las muestras de tejidos blandos fueron cortadas en trozos de 1 cm³ y secadas en estufa de flujo continuo a 100 °C hasta peso constante. Luego, se procedió al molido de las mismas y se tomó una submuestra de 500 mg de cada tejido. Cada submuestra fue sometida a una digestión ácida con una mezcla de 2 ml ácido nítrico (HNO₃, 68 % V/V), 2 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 98 % V/V) y 2 ml de ácido perclórico (HClO₄, 70 % V/V). Una vez terminado el proceso de digestión se llevó a un volumen de 25 ml, utilizando agua deionizada.

Las muestras de alimento y heces fueron secadas a 100 °C y molidas en un molino a martillo tipo Resch. Luego de obtener una submuestra de 500 mg de cada una, se procedió de acuerdo a lo descripto para tejidos blandos.

Las muestras de hueso fueron desengrasadas con acetona, durante 48 hs, enjuagadas con agua deionizada y llevadas a una mufla a 500 °C, durante 5 hs. De las cenizas obtenidas, se pesaron 500 mg y se procedió a tratamiento ácido y dilución como se describió previamente.

Las muestras de lana fueron lavadas con una solución de agua bidestilada y detergente neutro. Luego de enjuagadas repetidas veces con agua deionizada, fueron secadas a 60°C.

Una submuestra de 500 mg de cada una fue sometida a digestión ácida y dilución, para su posterior análisis.

Para la determinación de FA en plasma se utilizó el método colorimétrico cinético propuesto por Wiener Laboratorios (Rosario, Argentina), que usa como reactivo al p-nitrofenil fosfato. Para tal fin, se empleó un Autoanalizador Technicom RA100, con lectura a 405 nm de longitud de onda. Los resultados fueron expresados en unidades internacionales (UI)/L.

El N total de alimento, heces y orina fue determinado por la técnica semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1990). Los resultados se expresaron en porcentaje, base MS, en los dos primeros casos, y en $\mu\text{g/ml}$ en el caso de la orina.

Análisis estadístico: Las variables concentración de Zn, Cu y FA en plasma, hematocrito, concentración de hemoglobina en sangre y número de glóbulos rojos, leucocitos y linfocitos en sangre, fueron analizadas con el paquete estadístico SAS/STAT 9.1 (SAS, 2004), utilizando un modelo mixto de mediciones repetidas, de acuerdo a Littell et al. (1998). Se utilizó como término de error animal dentro de tratamiento. Se probaron distintas estructuras de covarianza y la que presentó el mejor ajuste, de acuerdo al criterio de Akaike y al criterio bayesiano de Schwartz, fue la estructura de covarianza autoregresiva de orden 1 para varianzas homogéneas (AR1). El modelo incluyó tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento x tiempo. Para el resto de los parámetros se utilizó un análisis de varianza de una vía.



Foto II.1. Disposición de las jaulas de un grupo sobre un costado del galpón.



Foto II.2. Detalle del frente de las jaulas con comedero y bebedero.



Foto II.3. El alimento se depositó en bidones de plástico, con una capacidad de 80 litros, debidamente rotulados.

Resultados

a. Ganancia de peso, producción y calidad de lana.

En ningún momento del ensayo los animales mostraron signos clínicos de deficiencia de Zn. La ganancia de peso de los dos grupos de corderos fue similar (Tabla II.4 y Figura II.1), y estuvo influida por episodios de acidosis, con la consecuente disminución del consumo, que afectaron indistintamente a miembros de cualquiera de los dos grupos. Esto fue debido a que, para conseguir niveles bajos de Zn en el alimento, debió recurrirse a ingredientes (como el almidón en polvo) con una rápida tasa de degradación ruminal. La inclusión de 3 % de bicarbonato de sodio a la ración contribuyó al control de este problema sólo en forma muy parcial.

La producción de lana sucia fue un 37,4 % más alta en el grupo suplementado con Zn (Tabla II.4). Sin embargo, no hubo diferencia en ninguno de los parámetros de calidad de lana evaluados (Tabla II.5).

Figura II.1. Evolución del peso de los corderos de ambos grupos experimentales.

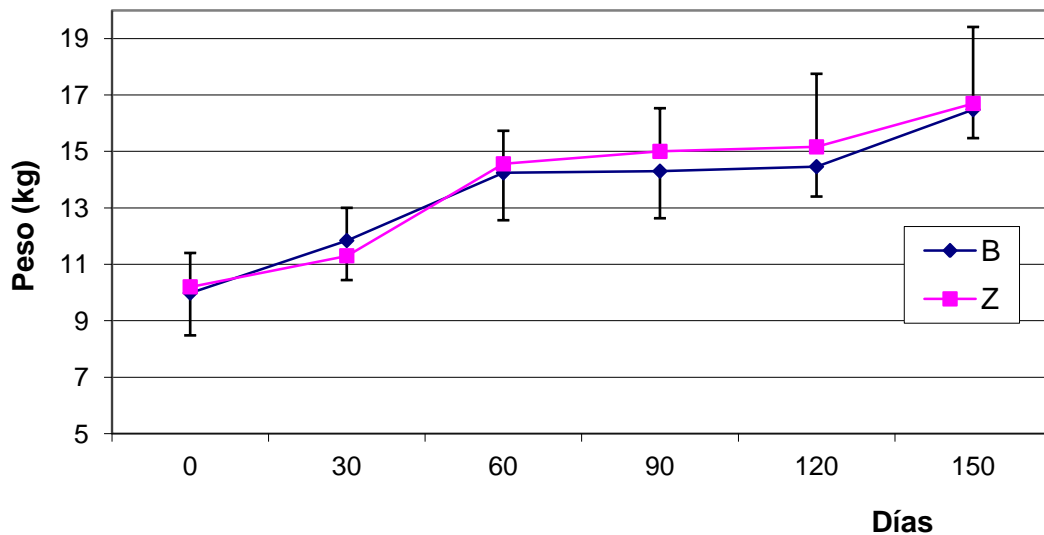


Tabla II.4. Ganancia de peso y producción de lana sucia en ambos grupos (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Ganancia de peso (kg)	6,5 \pm 1,23	6,5 \pm 1,90	0,99
Producción de lana sucia (g) ^x	15,94 \pm 2,42	21,90 \pm 1,46	<0,01

^x en un área de 80 cm².

Tabla II.5. Calidad de la lana (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Diámetro de fibras (μ)	22,66 \pm 1,74	21,74 \pm 1,59	0,4090
Curvatura de ondulación (grados/mm)	76,49 \pm 8,36	79,62 \pm 6,79	0,5343
Fibras con diámetro >30 μ (%)	9,78 \pm 4,78	8,96 \pm 4,57	0,7886
Resistencia a la tracción (Newtons/Ktex)	24,33 \pm 18,82	17,95 \pm 7,90	0,5042

b. Primer ensayo de balance.

La suplementación con Zn no tuvo efecto sobre la digestibilidad aparente de la MS (Tabla II.6). Sin embargo, la retención de N fue mayor en el grupo Z (Tabla II.7), lo que es explicado íntegramente por el hecho de que este grupo tuvo una menor excreción de N por orina, ya que la digestibilidad aparente del N fue similar en ambos grupos.

El grupo Z evidenció, como era esperable, una mayor retención de Zn (en mg/día) (Tabla II.8). Por el contrario, la absorción y la retención porcentuales fueron mayores en el grupo B, por la puesta en marcha de los fuertes mecanismos homeostáticos del Zn.

Aunque las diferencias numéricas no fueron grandes (52,8 % vs 46,8 %), hubo un efecto estadísticamente significativo ($P < 0,01$) de la adición de Zn sobre la digestibilidad (o absorción) aparente del Cu (Tabla II.9), mientras que la retención porcentual de Cu también tendió ($P < 0,10$) a ser menor en el grupo Z.

Tabla II.6. Digestibilidad aparente de la MS, primer ensayo (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Consumo de MS (g/d)	353,11 \pm 3,6	355,88 \pm 3,46	0,249
Excreción de MS (g/d)	83,06 \pm 5,81	89,46 \pm 6,04	0,126
MS Aparentemente digerida (g/d)	270,14 \pm 4,68	266,42 \pm 6,34	0,323
Digestibilidad Aparente de la MS (%)	76,48 \pm 1,52	74,86 \pm 1,68	0,148

Tabla II.7. Balance de N, primer ensayo (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Consumo de N (g/d)	9,0396 \pm 0,0920	9,1105 \pm 0,0885	0,249
Excreción de N en heces (g/d)	1,9456 \pm 0,1531	2,0536 \pm 0,316	0,511
N Aparentemente digerido (g/d)	7,0940 \pm 0,1982	7,0569 \pm 0,3402	0,839
Digestibilidad aparente del N (%)	78,4714 \pm 1,7583	77,4535 \pm 3,4854	0,576
Excreción de N en orina (g/d)	3,0616 \pm 0,3743	1,5256 \pm 0,8598	0,006
Retención de N (g/d)	4,0324 \pm 0,4988	5,5313 \pm 1,1513	0,028
Retención de N (%)	44,5671 \pm 5,1053	60,6920 \pm 12,4707	0,028

Tabla II.8. Balance de Zn, primer ensayo (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Consumo de Zn (mg/d)	3,5311 \pm 0,036	14,2352 \pm 0,1383	--
Excreción de Zn en heces (mg/d)	1,8496 \pm 0,4281	10,4816 \pm 0,4046	<0,001
Zn Aparentemente digerido (mg/d)	1,6815 \pm 0,4189	3,7536 \pm 0,5042	<0,001
Digestibilidad aparente del Zn (%)	47,6448 \pm 12,0033	26,3487 \pm 3,3411	0,0051
Excreción de Zn en orina (mg/d)	0,0261 \pm 0,0192	0,040 \pm 0,0245	0,348
Retención de Zn (mg/d)	1,6554 \pm 0,4110	3,7136 \pm 0,5183	<0,001
Retención de Zn (%)	46,91 \pm 11,79	26,07 \pm 3,44	0,0053

Tabla II.9. Balance de Cu, primer ensayo (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Consumo de Cu (mg/d)	3,5311 \pm 0,0360	3,5588 \pm 0,0346	0,249
Excreción de Cu en heces (mg/d)	1,6677 \pm 0,0711	1,8932 \pm 0,1371	0,011
Cu Aparentemente digerido (mg/d)	1,8634 \pm 0,0945	1,6656 \pm 0,1578	0,0429
Digestibilidad Aparente del Cu (%)	52,7579 \pm 2,3029	46,7837 \pm 4,1539	0,0027
Excreción de Cu en orina (mg/d)	0,0958 \pm 0,0440	0,0603 \pm 0,0292	0,171
Retención de Cu (mg/d)	1,7676 \pm 0,1135	1,6053 \pm 0,1836	0,131
Retención de Cu (%)	50,04 \pm 2,85	45,08 \pm 4,87	0,085

c. Segundo ensayo de balance.

Al igual que en primer ensayo de balance, no hubo efecto de la suplementación con Zn sobre la digestibilidad aparente de la MS (Tabla II.10). La retención de N tendió a ser mayor en el grupo Z (Tabla II.11). También la retención de Zn fue mayor en el grupo Z, mientras que la absorción y la retención porcentuales fueron mayores en el grupo B (Tabla II.12). Sin embargo, los efectos sobre la retención de Cu no se repitieron en el segundo ensayo de balance (Tabla II.13).

Tabla II.10. Digestibilidad aparente de la MS, segundo ensayo (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Consumo de MS (g/d)	242,36 \pm 2,52	243,24 \pm 1,79	0,5418
Excreción de MS (g/d)	60,86 \pm 11,77	68,66 \pm 6,41	0,230
MS Aparentemente digerida (g/d)	181,50 \pm 12,23	174,59 \pm 6,44	0,2959
Digestibilidad aparente de la MS (%)	74,88 \pm 4,86	71,78 \pm 2,62	0,2437

Tabla II.11. Balance de N, segundo ensayo (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Consumo de N (g/d)	6,2044 \pm 0,0645	6,2269 \pm 0,0457	0,5419
Excreción de N en heces (g/d)	0,9702 \pm 0,2303	0,9173 \pm 0,1524	0,5111
N Aparentemente digerido (g/d)	5,2342 \pm 0,2800	5,3096 \pm 0,1709	0,6209
Digestibilidad aparente del N (%)	84,34 \pm 3,85	85,26 \pm 2,47	0,6631
Excreción de N en orina (g/d)	2,0829 \pm 0,5569	1,4601 \pm 0,3752	0,0714
Retención de N (g/d)	3,1514 \pm 0,6434	3,8496 \pm 0,3705	0,0686
Retención de N (%)	50,73 \pm 9,87	61,83 \pm 6,01	0,0581

Tabla II.12. Balance de Zn, segundo ensayo (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Consumo de Zn (mg/d)	2,4236 \pm 0,0252	9,7296 \pm 0,0714	< 0,001
Excreción de Zn en heces (mg/d)	0,5840 \pm 0,1345	6,6905 \pm 1,0109	<0,001
Zn Aparentemente digerido (mg/d)	1,8396 \pm 0,1266	3,0391 \pm 1,0706	0,0377
Digestibilidad aparente del Zn (%)	75,92 \pm 5,45	31,18 \pm 10,84	<0,001
Excreción de Zn en orina (mg/d)	0,1788 \pm 0,0886	0,1831 \pm 0,0828	0,9380
Retención de Zn (mg/d)	1,6609 \pm 0,2005	2,8560 \pm 1,0398	0,0356
Retención de Zn (%)	68,56 \pm 8,51	28,30 \pm 10,54	<0,001

Tabla II.13. Balance de Cu, segundo ensayo (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Grupo B	Grupo Z	P
Consumo de Cu (mg/d)	2,4236 \pm 0,0252	2,4324 \pm 0,0179	0,5417
Excreción de Cu en heces (mg/d)	0,7412 \pm 0,1264	0,6429 \pm 0,0710	0,1678
Cu Aparentemente digerido (mg/d)	1,6824 \pm 0,1488	1,7896 \pm 0,0781	0,1919
Digestibilidad aparente del Cu (%)	69,38 \pm 5,44	73,57 \pm 2,97	0,1695
Excreción de Cu en orina (mg/d)	0,0783 \pm 0,0427	0,0530 \pm 0,0162	0,2512
Retención de Cu (mg/d)	1,6042 \pm 0,1673	1,7366 \pm 0,0788	0,1481
Retención de Cu (%)	66,15 \pm 6,29	71,39 \pm 3,11	0,1336

d. Niveles de Zn, Cu y fosfatasa alcalina en plasma. Parámetros hematológicos.

El nivel promedio de Zn en plasma (Figura II.2) fue significativamente mayor en el Grupo Z (0,68 μ g/ml) que en el grupo B (0,40 μ g/ml), aún cuando en el modelo se incluyeron los valores iniciales (medición 0). Hubo efectos muy significativos ($P < 0,01$) de tratamiento, tiempo e interacción tratamiento x tiempo. Cuando se analizó cada una de las mediciones separadamente, las diferencias entre grupos también fueron muy significativas ($P < 0,01$).

Sin embargo, la suplementación con Zn no tuvo efecto sobre los niveles de FA en plasma (Figura II.4). Los niveles de Cu plasmático fueron afectados por la suplementación por Zn, pero sólo en la última medición (Figura II.3).

Los parámetros hematológicos medidos (hematocrito, número de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina, número de leucocitos y linfocitos en sangre, Figuras II.5, II.6, II.7, II.8 y II.9) no fueron modificados por la suplementación con Zn.

Figura II.2. Evolución del Zn plasmático en los corderos de ambos grupos experimentales.

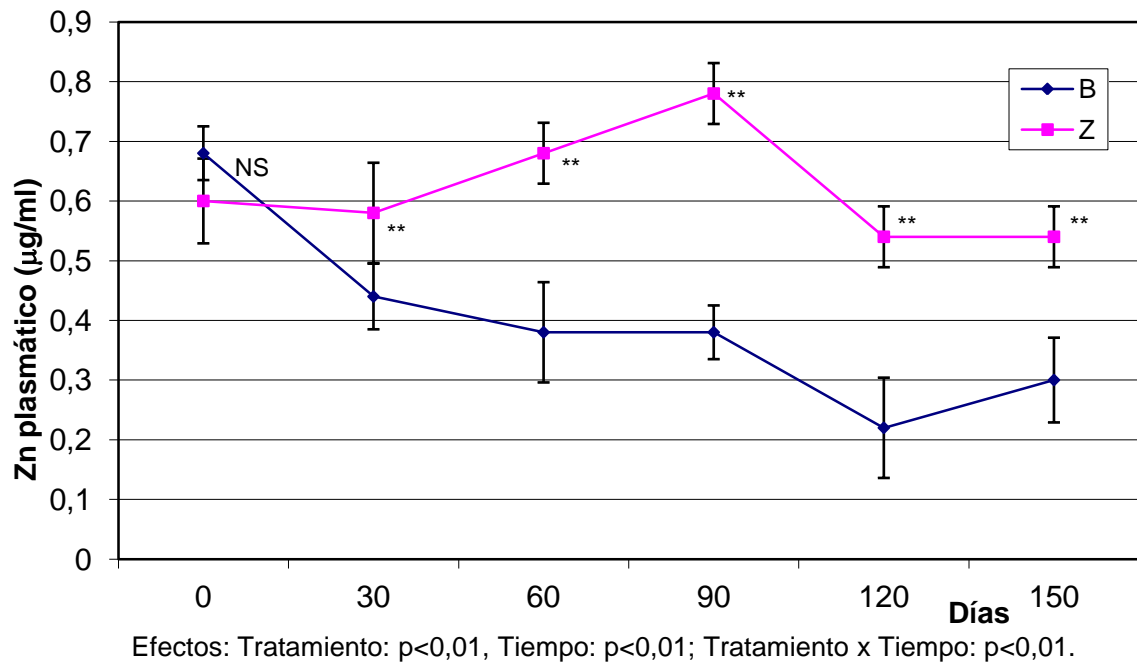


Figura II.3. Evolución del Cu plasmático en los corderos de ambos grupos experimentales.

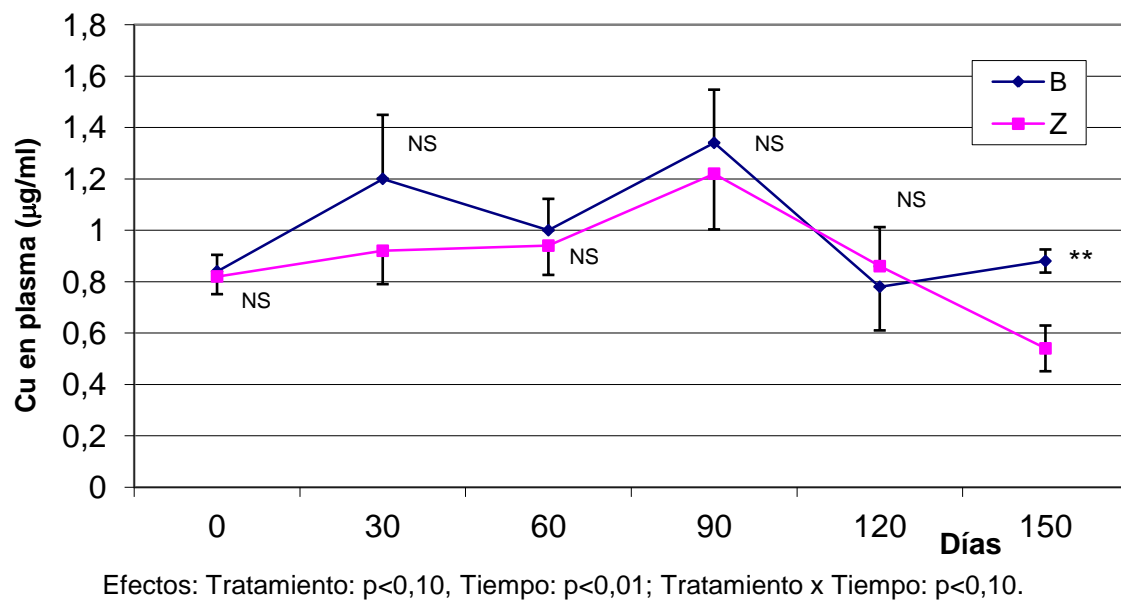


Figura II.4. Evolución de los niveles de fosfatasa alcalina en los corderos de ambos grupos experimentales.

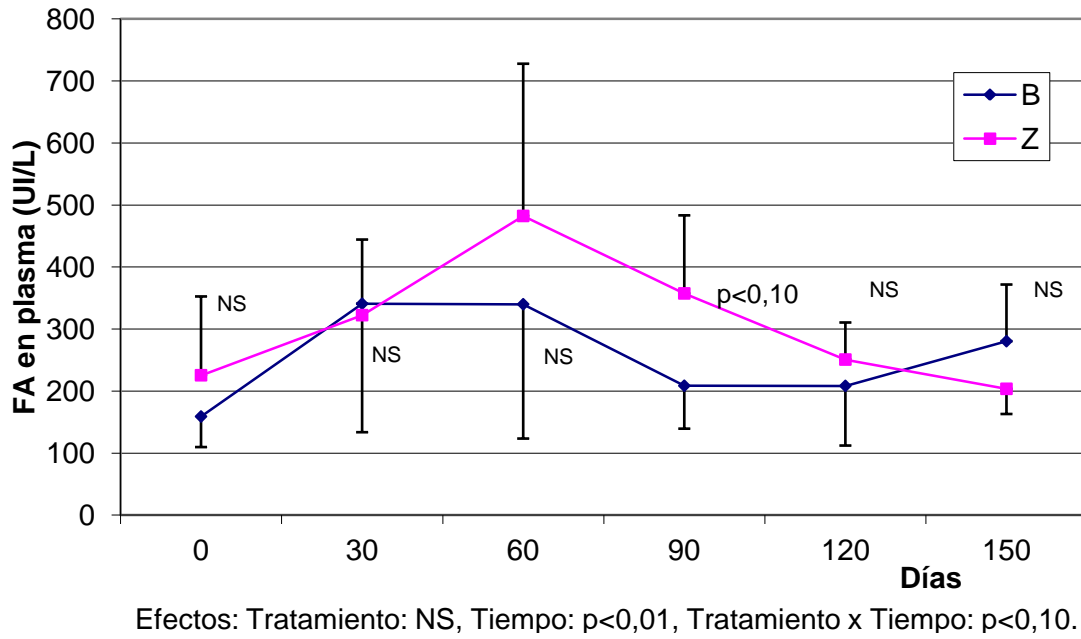


Figura II.5. Evolución del hematocrito en los corderos de ambos grupos experimentales.

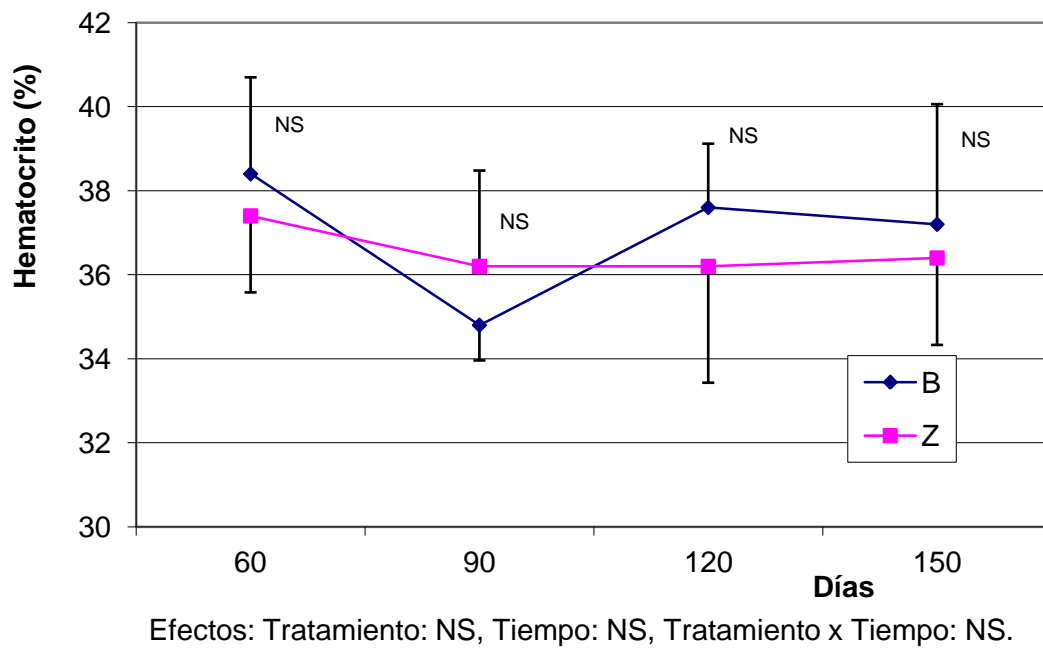
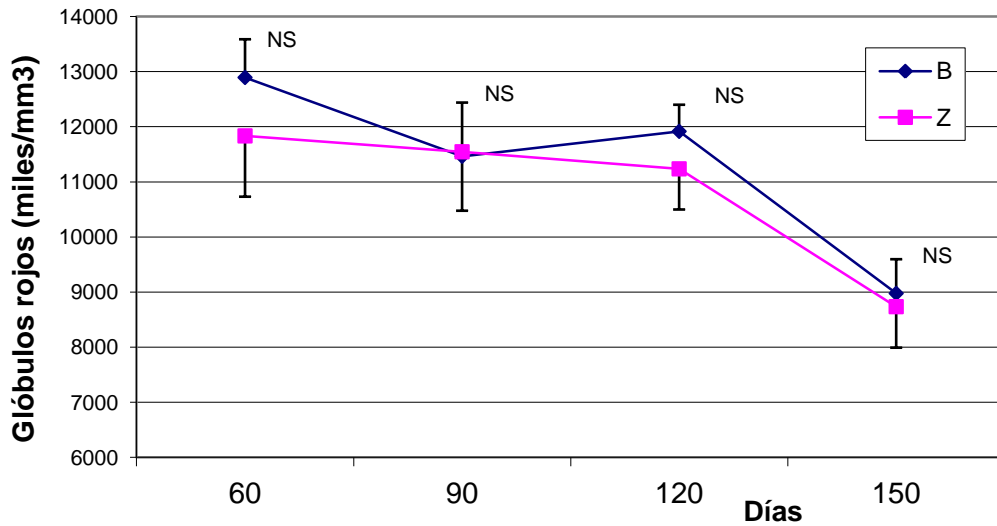
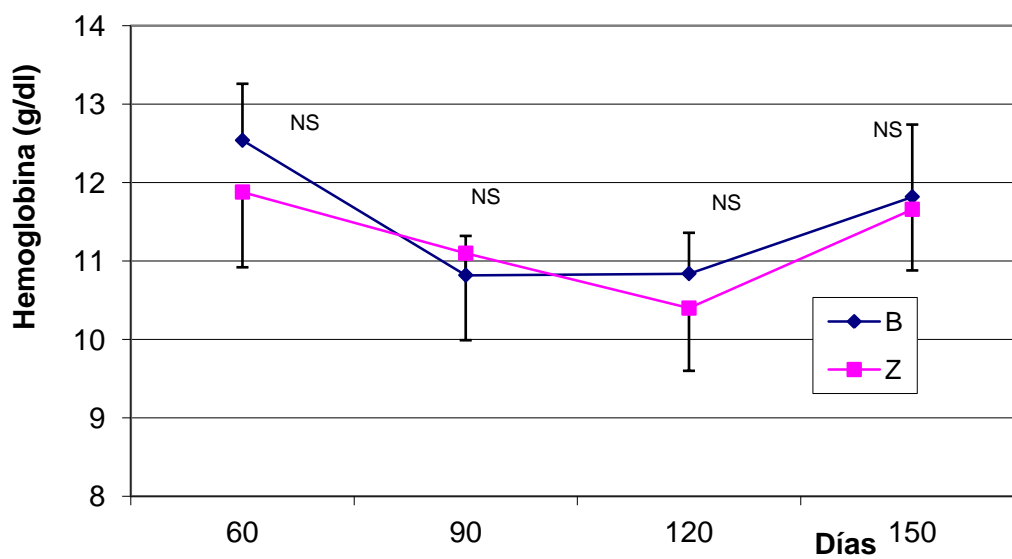


Figura II.6. Evolución del número de glóbulos rojos en sangre de los corderos de ambos grupos experimentales.



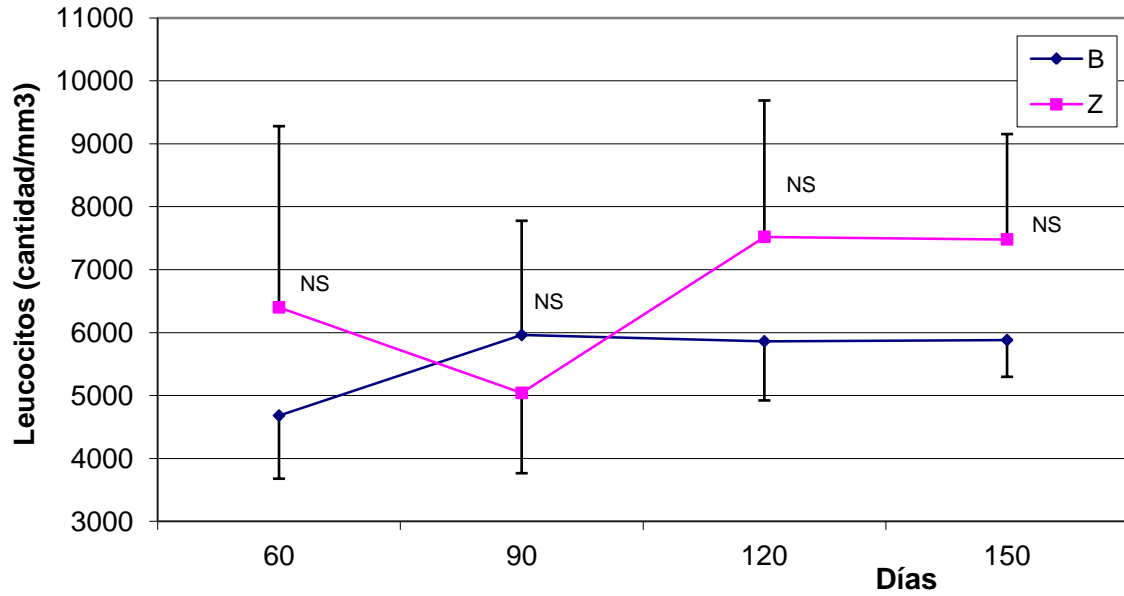
Efectos: Tratamiento: NS, Tiempo: $p < 0,05$, Tratamiento x Tiempo: NS.

Figura II.7. Evolución de la concentración de hemoglobina en sangre en los corderos de ambos grupos experimentales.



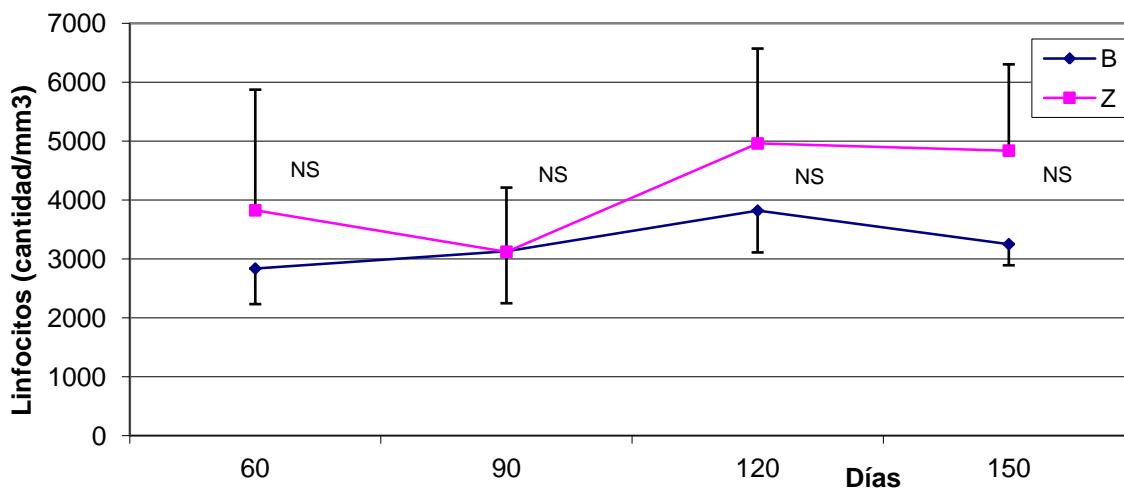
Efectos: Tratamiento: NS, Tiempo: $p < 0,05$, Tratamiento x Tiempo: NS.

Figura II.8. Evolución de la concentración del número de leucocitos en sangre en los corderos de ambos grupos experimentales.



Efectos: Tratamiento: NS, Tiempo: $p < 0,10$, Tratamiento x Tiempo: $p < 0,05$.

Figura II.9. Evolución del número de linfocitos en sangre en los corderos de ambos grupos experimentales.



Efectos: Tratamiento: NS, Tiempo: $p < 0,05$, Tratamiento x Tiempo: NS.

e) Concentración de minerales en órganos:

Como se observa en el Tabla II.14, la deficiencia de Zn disminuyó los niveles de Zn, alrededor de un 30 %, en ambos huesos muestreados y tendió a disminuirlos en hígado, en una proporción menor (10 %).

Por otro lado, la deficiencia de Zn incrementó la concentración de Cu en hígado y en lana (Tabla II.15). Contrariamente, tendió a disminuir la concentración de Cu en páncreas, aunque la diferencia numérica fue muy pequeña.

Tabla II.14. Concentración de Zn en órganos (valores expresados como promedio \pm DE).

Órgano	Grupo B	Grupo Z	P
Músculo semimembranoso	67,6 \pm 6,95	74,4 \pm 5,13	0,12
Músculo supraescapular	96,7 \pm 23,1	91,4 \pm 27,14	0,75
Músculo longissimus dorsi	66,0 \pm 7,48	64,2 \pm 5,36	0,67
Riñón	84,0 \pm 4,0	85,2 \pm 13,2	0,85
Pulmón	72,6 \pm 2,61	79,0 \pm 16,78	0,42
Hígado	89,3 \pm 8,53	102,2 \pm 11,78	0,08
Testículo	69,2 \pm 5,63	65,0 \pm 7,25	0,33
Páncreas	71,4 \pm 10,67	69,2 \pm 14,88	0,79
Metacarpo	62,2 \pm 12,4	91,34 \pm 11,7	0,005
Metatarso	62,6 \pm 16,8	90,54 \pm 8,25	0,01
Lana	84,80 \pm 11,48	104,20 \pm 36,05	0,28

Tabla II.15. Concentración de Cu en órganos (valores expresados como promedio \pm DE).

Órgano	Grupo B	Grupo Z	P
Músculo semimembranoso	4,78 \pm 1,04	7,38 \pm 3,49	0,15
Músculo supraescapular	6,54 \pm 1,68	8,34 \pm 4,47	0,42
Músculo longissimus dorsi	6,70 \pm 2,08	5,28 \pm 2,94	0,40
Riñón	13,94 \pm 0,89	15,24 \pm 3,44	0,44
Pulmón	17,64 \pm 8,60	14,3 \pm 5,20	0,48
Hígado	227,8 \pm 38,36	132,1 \pm 61,86	0,02
Testículo	8,12 \pm 1,84	7,74 \pm 2,60	0,80
Páncreas	6,64 \pm 1,14	8,44 \pm 1,59	0,07
Metacarpo	5,94 \pm 0,89	5,34 \pm 1,88	0,54
Metatarso	5,29 \pm 0,93	4,88 \pm 0,95	0,51
Lana	9,26 \pm 1,30	6,54 \pm 0,94	0,005

f) Histopatología:

En el Anexo del Capítulo II se presentan las imágenes de los principales hallazgos a nivel de los distintos tejidos. Los cambios más relevantes a nivel histopatológico posiblemente relacionados con la deficiencia de Zn fueron hallados en esófago, lengua y rumen.

Cuando se realizó la comparación con el grupo Z, dos individuos del grupo B presentaron el epitelio del esófago hiperplásico, con un engrosamiento de grado moderado y con un incremento en el número de células que llegó, en algunos sitios al 30 % (Fotos II.4 y II.5).

Sólo en un individuo del grupo B se observó algún grado de queratinización defectuosa en el epitelio de lengua, lo que puede describirse como hiperqueratosis, y exclusivamente en la región dorsal de la misma (Fotos II.6 y II.7).

En los preparatos histológicos de epitelio de rumen del grupo B se observó un engrosamiento del estrato córneo de las papilas, en dos individuos del grupo B, a expensas de una mayor cantidad de células vacuoladas, también llamadas globosas (Fotos II.8 y II.9).

No se presentaron diferencias histológicas entre los grupos en piel, testículo, páncreas y epitelio de vejiga.

En huesos metacarpiano y metatarsiano no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las superficies de los cartílagos de crecimiento de ambos grupos (Tabla II.16), así como tampoco diferencias apreciables a nivel histológico.

Tabla II.16. Superficie de cartílago de crecimiento de metacarpo y metatarso (en μ^2). Valores expresados como promedio \pm DE.

Hueso	Grupo B	Grupo Z	P
Metacarpo	24.942,4 \pm 3.755,4	28.306,8 \pm 10.304,8	0,51
Metatarso	20.742,0 \pm 3.922,2	25.266,0 \pm 7.886,4	0,28

Discusión

Miller et al. (1963) alimentaron a terneros durante 29 semanas con una dieta experimental que contenía 9,8 ppm de Zn sin encontrar signos clínicos de la deficiencia, lo cual es comparable con nuestro trabajo, en el cual la dieta Basal contenía 10 ppm. En el mismo sentido, y de acuerdo a los resultados de Ott et al. (1964) con corderos, se deben conseguir niveles menores de Zn en alimento para la aparición de dichos signos.

White et al. (1994), trabajando con corderos, hallaron que los grupos alimentados con 17 y 27 ppm de Zn, tenían una superior producción de lana sucia que el grupo que recibía 10 ppm de Zn, y también que el grupo con deficiencia clínica (con 4 ppm de Zn). En nuestro ensayo, los resultados de la suplementación son coincidentes, corroborando que los niveles usados son compatibles con un modelo de deficiencia subclínica de Zn, en el que está afectada significativamente la producción.

También en forma coincidente con nuestro estudio, White et al. (1994) no hallaron diferencias entre las ganancias de peso de los grupos que recibían 10, 17 y 27 ppm de Zn, demostrando que éste es un parámetro menos sensible que la producción de lana, o ciertos indicadores bioquímicos (como la concentración sérica de Zn), frente a la deficiencia del mineral. En un ensayo realizado con anterioridad (Ott et al., 1965b), niveles de 18 ppm de Zn

en la dieta experimental de los corderos no maximizaron los parámetros consumo de alimento, ganancia de peso y Zn sérico, pero las diferencias en los dos primeros parámetros fueron pequeñas con respecto al grupo inmediato superior (33 ppm de Zn).

La suplementación con Zn no afectó la digestibilidad de la MS, pero mejoró la retención de N. Estos resultados tienen relación con el importante rol del Zn en la síntesis de proteínas, y concuerdan también con los de Somers y Underwood (1969), aunque estos investigadores trabajaron con un grupo deficiente con niveles dietarios más bajos (2,4 ppm de Zn), que expresó signos clínicos de la deficiencia, y un grupo suplementado pareado por consumo. Si bien, de acuerdo a nuestro ensayo, 10 ppm de Zn no parecen maximizar la retención de N, los requerimientos de Zn de corderos en crecimiento, al menos considerando esta variable, no parecen estar mucho más allá de 15 o 20 ppm, ya que Kegley y Spears (1994) no encontraron ningún efecto cuando adicionaron Zn en dietas a base de heno de festuca (*Festuca arundinacea*) o de pasto ovido (*Dactylis glomerata*) que estaban en este rango de concentraciones.

La eficiencia de retención y la digestibilidad aparente del Zn fueron mayores en el grupo B, lo que demuestra la puesta en marcha de los mecanismos homeostáticos, relacionados con un incremento en la eficiencia de absorción y una disminución de la excreción fecal endógena del mineral, ya que la excreción urinaria no tiene, en este sentido, un rol importante. Estos mecanismos han sido ampliamente demostrados en monogástricos (Fairweather-Tait y Hurrell, 1996; King et al., 2000) y en rumiantes (Miller, 1969). Los resultados de absorción aparente de Zn (47,6 % vs 26,3%) hallados en el primer ensayo de balance son comparables con los valores de absorción neta informados por Neathery et al. (1973) y por Stake et al. (1975) en vacas lecheras, y con los valores de absorción aparente hallados por Kirchgessner et al. (1978). En este trabajo, cuando vacas lecheras en producción fueron pasadas de una dieta normal a una deficiente (6 ppm de Zn) la absorción aparente aumentó del 22 al 51 % al término de una semana, y luego siguió aumentando hasta alcanzar el 66 % a la sexta semana. En nuestro segundo ensayo de balance, la retención porcentual de Zn en el grupo B fue superior a la del primer ensayo de balance (68,56 %), lo cual puede obedecer a que el consumo de Zn fue sustancialmente menor.

En nuestro trabajo, la suplementación con Zn incrementó la retención absoluta de Zn en ambos ensayos de balance. Kegley y Spears (1994) también hallaron similares resultados en corderos, aún cuando los alimentaron con una dieta natural a base de heno de pasto ovido (*Dactylis glomerata*). Este forraje contenía una concentración de Zn de 21,4 ppm y se adicionaron 30 mg de Zn/día (un equivalente a 27,5 ppm de la dieta total). Esto sugiere que dietas con 10 ppm de Zn están lejos de maximizar la retención de Zn en corderos y que dicha variable resultaría interesante para implementar ensayos de BDR con dosis crecientes de Zn en alimento. Por otro lado, los resultados de retención absoluta de Zn de los grupos B en ambos ensayos de balance son muy similares, aún cuando los consumos de Zn de los animales fueron diferentes, lo cual pone de manifiesto, nuevamente, la adaptación homeostática del organismo frente a la deficiencia de Zn.

Aún cuando elevadas cantidades de Zn pueden antagonizar la absorción de Cu, aún es discutido cuál es el máximo nivel tolerable de Zn en las dietas de los rumiantes. Niveles de suplementación dentro de los rangos encontrados en forrajes no parecen afectar la proporción de Cu absorbido y retenido en ovinos (Kegley y Spears, 1994). En nuestro trabajo, en el primer ensayo de balance, la suplementación con Zn disminuyó la absorción aparente de Cu y

tendió a disminuir la retención del mismo. Este efecto antagónico, aunque pequeño, podría haberse manifestado debido a los bajos niveles de otros antagonistas del Cu (molibdeno, hierro y azufre), cuya importancia es mucho mayor en situaciones de alimentación pastoril. Los resultados no se repitieron en el segundo ensayo de balance y las diferencias en cuanto a la absorción y la retención de Cu no fueron estadísticamente significativas.

El descenso tardío de los niveles de Cu plasmático en el grupo Z podría suponer el efecto de una posible depleción progresiva de las reservas hepáticas de Cu, lo que se relaciona con los menores niveles hallados al finalizar el ensayo en este grupo con respecto al grupo B (alrededor de la mitad de los del grupo Z) y también con la menor concentración de Cu en lana en el grupo B. Sin embargo, de acuerdo a la bibliografía (Underwood y Suttle, 1999), la concentración de Cu en hígado está por encima de la indicativa de una deficiencia del mineral y no debería haberse reflejado, por lo tanto, en un descenso de la cupremia.

Existen dos trabajos en la bibliografía que parecen reforzar la importancia de nuestros hallazgos. En cerdos, Hill et al. (1983) encontraron que la adición de tan sólo 50 ppm de Zn fue suficiente para disminuir los niveles de Cu hepático de 17 a 10 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco. En un ensayo similar al nuestro (White et al., 1994), la adición de Zn a una dieta basal que contenía 4 ppm de Zn disminuyó linealmente la concentración de Cu en lana. Sin embargo, estos autores no midieron Cu hepático o sérico.

Nuestros resultados confirman que el Zn plasmático (o sérico) es un indicador precoz y sensible de deficiencia de Zn, y revelan una relación lógica con los resultados de ambos ensayos de balance de Zn. Por otro lado, los niveles plasmáticos de Zn del Grupo B muestran una tendencia lineal decreciente, a medida que progresa la depleción.

Aún cuando en deficiencias severas de Zn, en animales en crecimiento, la concentración tisular puede disminuir finalmente en varios órganos, los mayores cambios se observan en hueso y, en segundo lugar, en hígado (Giuliano y Millward, 1984), siguiendo una tendencia similar en deficiencias marginales (Zhou et al., 1993), como la de nuestro ensayo, en el que el Zn óseo disminuyó alrededor de un 30 % y el Zn hepático sólo un 10 %.

Nuestro trabajo no puede discriminar si la menor concentración final de Zn óseo en el Grupo B es el resultado de un incremento en la resorción, una disminución en la deposición o ambas simultáneamente. Las investigaciones realizadas con ratas adultas preñadas demuestran que la deficiencia de Zn resulta en una movilización tisular de Zn hacia los fetos, pero el hueso no parece jugar un rol específico frente a otros tejidos, por ejemplo el músculo (Masters et al., 1988), y que la pequeña movilización de Zn óseo no es suficiente para prevenir los efectos teratogénicos propios de la deficiencia del mineral (Hurley y Swenerton, 1971). Zhou et al. (1993) hallaron que entre un 10 y un 20 % del pool óseo de Zn puede ser liberado frente a una deficiencia marginal de Zn en ratas jóvenes en crecimiento, a diferencia de lo que sucedía con el Zn hepático y muscular. Lo que resulta aún más interesante, en lechones alimentados con una dieta deficiente en Zn (4 ppm) a los que se les realizaron biopsias semanales de hueso, la concentración de Zn óseo disminuyó paulatinamente durante las 5 semanas del ensayo (Bobilya et al., 1994). En nuestro ensayo, los hallazgos referidos a las concentraciones de Zn en tejidos al momento de la faena, parecen confirmar, entonces, el rol central del hueso dentro de los mecanismos homeostáticos frente a una deficiencia de Zn en rumiantes jóvenes. Por lo demás, permiten sospechar la existencia de un movimiento del Zn corporal desde un pool no esencial (hueso) o de reserva (hígado) para sostener un pool esencial de Zn, conforme a lo propuesto por los modelos compartimentales basados en

estudios con isótopos no radioactivos en humanos (Fairweather-Tait et al., 1993; Miller et al., 1994; Swinkels et al., 1994).

En nuestro ensayo, la concentración de Zn en lana fue numéricamente menor en el Grupo B, pero probablemente el alto coeficiente de variación y el bajo número de animales llevaron a que esa diferencia no fuera significativa. En el ensayo de White et al. (1994) se encontraron diferencias en esta variable entre los grupos deficiente (4 ppm) y suplementados, pero no entre los corderos alimentados con 10, 17 y 27 ppm de Zn en la dieta, lo cual coincide con nuestros hallazgos en el sentido de que el Zn en lana es un indicador menos sensible que el Zn plasmático.

Miller et al. (1965), Adeniyi y Heaton (1980) y Spears (1989) informaron de respuestas significativas a la suplementación con Zn sobre los niveles de FA, trabajando con terneros, ratas y corderos, respectivamente. La falta de efectos, en nuestro ensayo, de la suplementación con Zn sobre dicha enzima puede parcialmente explicarse debido a su falta de especificidad, ya que, por un lado, este parámetro implica la medición de la actividad fosfatasa total del plasma, sin considerar su origen, y, por otro lado, puede responder a otros factores diferentes al Zn. Además de ello, la actividad de FA siempre fue afectada por un importante coeficiente de variación entre individuos. La búsqueda de biomarcadores del status de Zn, y específicamente de enzimas Zn dependientes, sigue siendo un campo de activa investigación (Hambidge, 2003).

En informes de deficiencias de Zn naturalmente halladas en bovinos (Al-Saad et al., 2011) y ovinos (Al-Saad et al., 2010) se halló una disminución en el hematocrito, la concentración de hemoglobina y el número de glóbulos rojos. Miller et al. (1965b) también encontraron, en un ensayo con terneros Holstein, que el grupo deficiente (con severas lesiones paraqueratóticas y gran retraso del crecimiento) tenía niveles de hemoglobina menores que el grupo pareado por consumo. Otros autores también señalaron resultados similares en cerdos (Hoefer et al., 1960; Miller et al., 1968), pero estos ensayos no tenían un grupo control pareado por consumo, de manera que, al menos en parte, los efectos sobre parámetros hematológicos pueden ser atribuidos a una disminución en el consumo de alimento. Si bien este tipo de parámetros puede estar más directamente relacionado con una deficiencia de Fe, también podría vincularse con una deficiencia de Zn debido a los efectos generales sobre la síntesis de proteínas y otros efectos metabólicos. En nuestro ensayo, luego de 5 meses de depleción, no hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tres indicadores arriba mencionados, entre los grupos B y Z, lo que sugiere que son relativamente poco sensibles o bien requieren un tiempo mayor de depleción.

En ningún caso, los cambios a nivel histopatológico hallados en animales del grupo B fueron comparables a los informados por distintos investigadores que trabajaron con niveles dietarios de Zn más bajos y que causaron signos clínicos marcados. Por ejemplo, los trabajos de Barney et al. (1964), Diamond et al. (1971) y Mutch y Harley (1974) con ratas señalan defectos mucho más manifiestos en epitelio esofágico, aunque no pudieron hallarse estudios comparativos en ovinos. En el ensayo de Barney et al. (1968), 11 de 18 animales deficientes en Zn, mostraron extensas zonas engrosadas en epitelio esofágico, cuyo número de células duplicaba al hallado en los animales suplementados.

La bibliografía es muy escasa en lo referente a los efectos de la deficiencia de Zn sobre el epitelio lingual, pero los trabajos realizados por Mann et al. (1974) en ovinos, Barney et al. (1967) en monos títi y Joseph et al. (1981) en conejos señalan como un hallazgo prominente los defectos en la queratinización de este epitelio. La severidad y la frecuencia del hallazgo de

estos defectos en los ovinos de nuestro ensayo es, evidentemente, mucho menor que la informada por estos investigadores.

Existen algunos trabajos (Miller y Miller, 1960; Kroneman et al., 1975) que asocian la deficiencia de Zn en rumiantes con lesiones en epitelio ruminal identificadas por los autores como paraqueratosis. Sin embargo, la descripción es muy pobre y es notoria la ausencia de imágenes de las mismas. Ott et al. (1964), en corderos que presentaron una deficiencia clínica de Zn y severas lesiones de paraqueratosis en piel, no hallaron ninguna anomalía en epitelio de preestómagos. Trabajos antiguos también describían como paraqueratosis ruminal a lesiones inducidas por acidosis ruminal (Bull et al., 1965). En base a la literatura actual, aún no existe acuerdo en cuanto a una descripción diferenciada y clara de las lesiones provocadas por una deficiencia de Zn y aquellas provocadas por la acidosis ruminal subaguda. Por ejemplo, Steele et al. (2009) describen como paraqueratosis ruminal, es decir, una excesiva proliferación celular y una diferenciación celular aberrante en el epitelio escamoso estratificado del rumen, con queratinocitos indiferenciados en el estrato córneo, a los hallazgos histopatológicos inducidos durante un proceso de adaptación acelerada a dietas de alto contenido en granos. Los mismos autores, en otro trabajo (Steele et al., 2012) prefieren describir como hiperqueratosis (un engrosamiento de la capa córnea del epitelio ruminal, explicado por un incremento en las capas de células córneas globosas y translúcidas) a las lesiones provocadas en corderos por la adaptación a dietas altas en granos, y, probablemente, sea ésta la opción más acertada. De todas maneras, muchos procesos de acidosis ruminal son acompañados por fenómenos inflamatorios (ruminitis), que ayudan a diferenciar más claramente el cuadro (Nagaraja y Titgemeyer, 2007). Por otro lado, la cantidad de células globosas en la capa córnea puede tener relación con el tipo de forraje utilizado. En el trabajo de Neiva et al. (2006) con ovinos que comieron 4 diferentes tipos de dieta, pudo observarse una menor cantidad de este tipo de células cuando los animales se alimentaron con mayor cantidad de forraje grosero. Bacha y Bacha (2001), presentan como normal una cantidad variable de células globosas queratinizadas en el epitelio ruminal. A la luz de lo anteriormente citado, no puede sostenerse una relación lógica entre los hallazgos de nuestro ensayo y la deficiencia de Zn, y, si esta última actúa como factor predisponente para algunas alteraciones asociadas con la acidosis ruminal, puede ser un tema objeto de posteriores investigaciones.

Las típicas lesiones paraqueratósicas de piel encontradas en animales con deficiencias clínicas de Zn, como por ejemplo las informadas por Ott et al. (1964) y por Norrdin et al. (1973), no pudieron hallarse en ningún animal de nuestro ensayo. Tampoco se hallaron cambios más sutiles, a nivel de folículos lanosos, como los informados por White et al. (1994).

Conclusiones

Tomados en su conjunto, y a pesar de la ausencia de lesiones macroscópicas notorias, los resultados de este ensayo demuestran consistentemente la validez del modelo de deficiencia de Zn. Varios indicadores pueden ser utilizados en ensayos de BDR: crecimiento de lana, concentración sérica y tisular de Zn, y balance de Zn. Las variables hematológicas medidas y las modificaciones histológicas en epitelios y órganos glandulares no parecen promisorias para dicho tipo de ensayos.

Anexo del Capítulo II

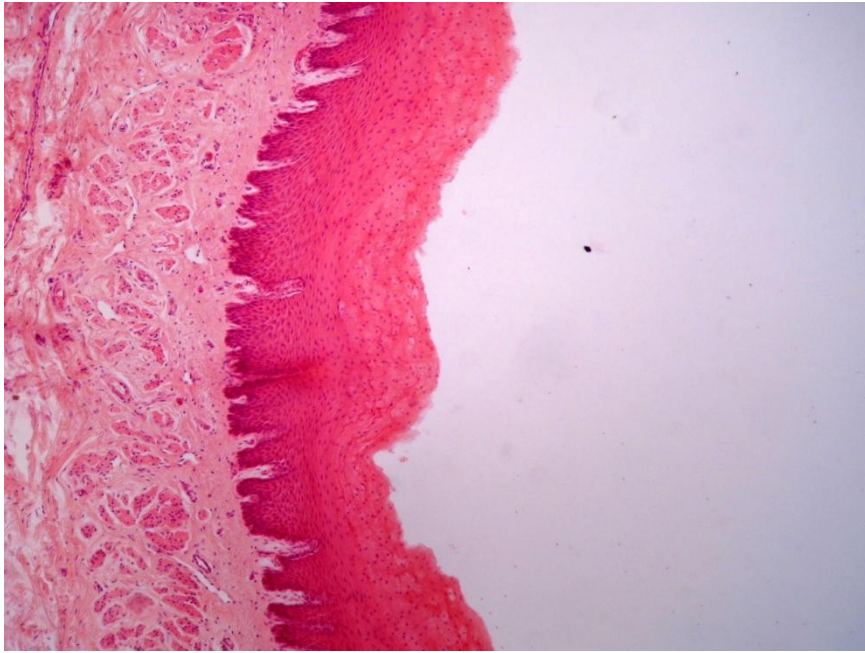


Foto II.4. Esófago grupo Z (H-E, 100x).

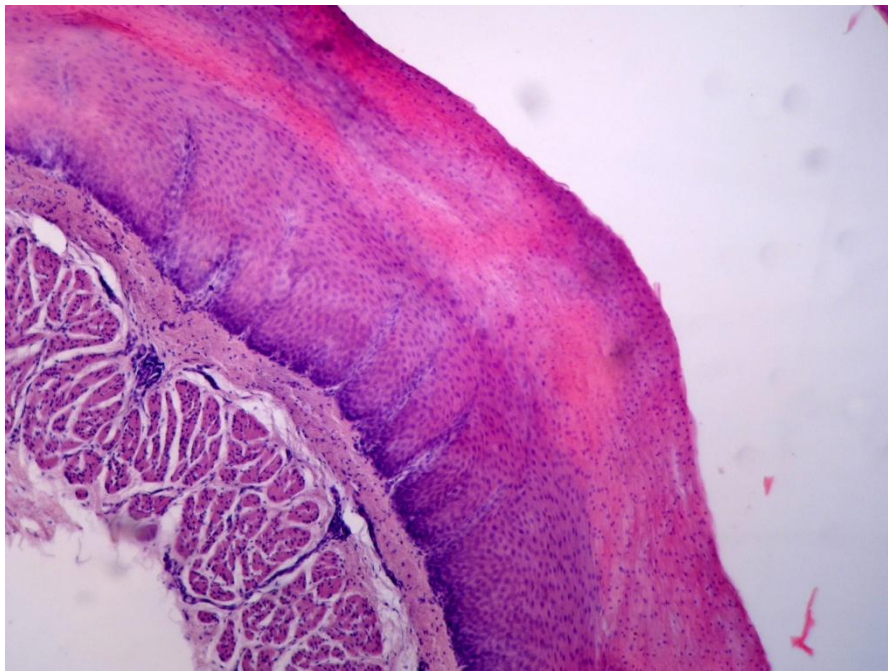


Foto II.5. Esófago grupo B (H-E, 100x).

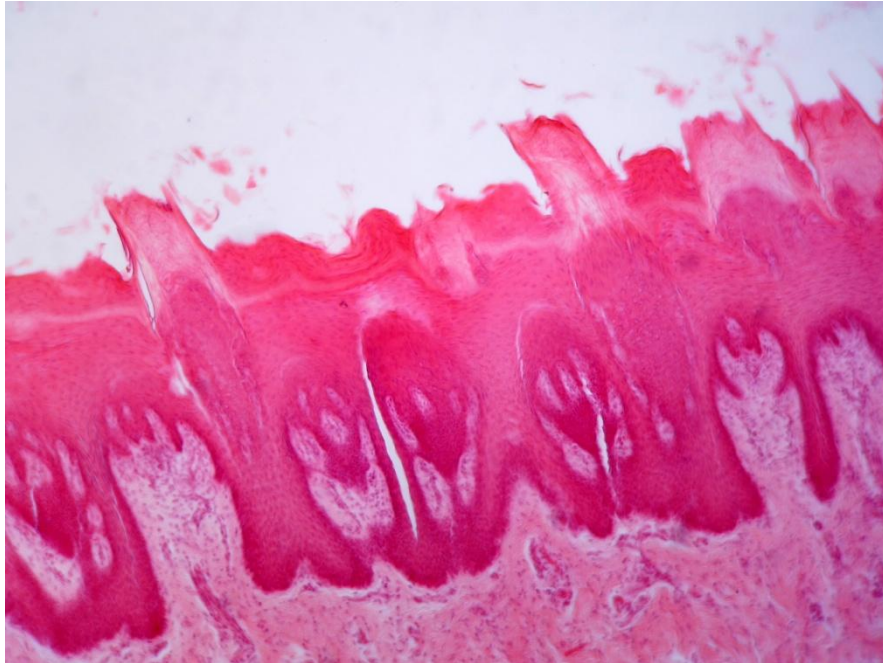


Foto II.6. Lengua grupo Z (H-E, 100x).

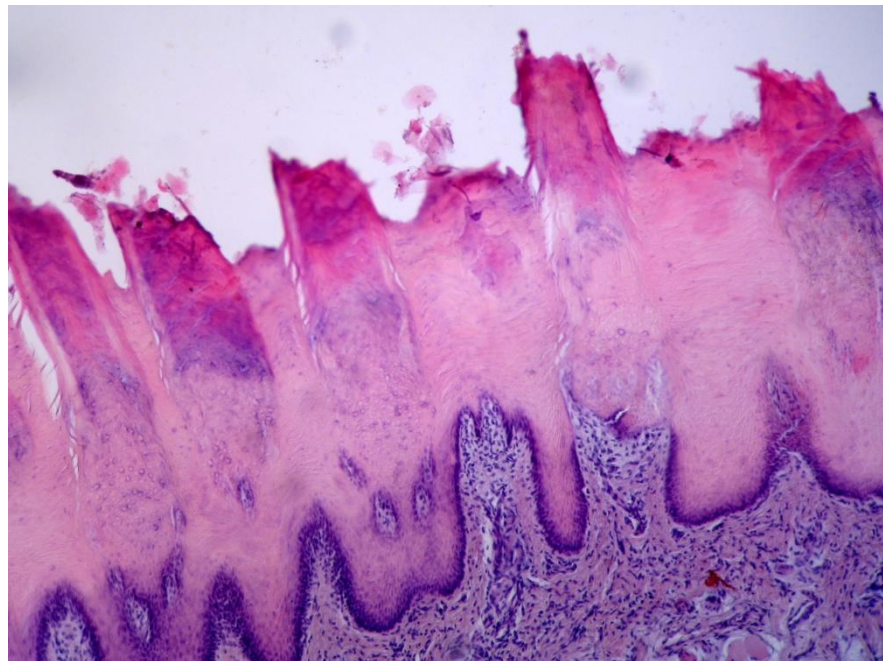


Foto II.7. Lengua grupo B (H-E, 100x).

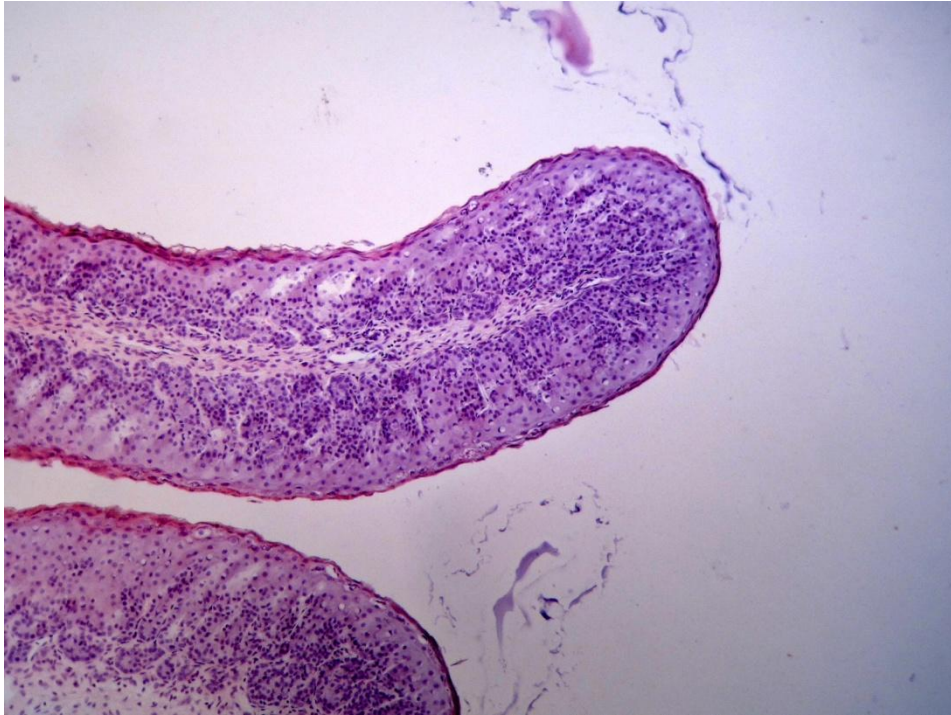


Foto II.8. Rumen grupo Z (H-E, 100x).

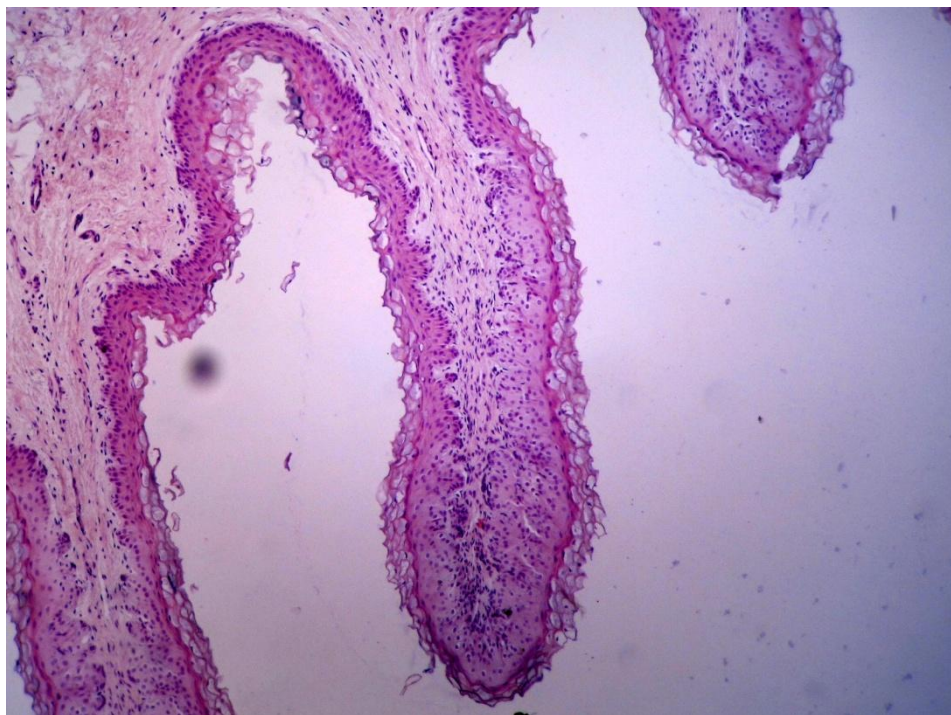


Foto II.9. Rumen grupo B (H-E, 100x).

Capítulo III: Biodisponibilidad relativa del zinc a partir de un complejo aminoácidos-Zn con respecto a la fuente patrón (sulfato de Zn) en corderos

Introducción

1) Esencialidad

Aunque Birckner (1919) había sugerido que el Zn podría ser un nutriente requerido por los animales superiores, las pruebas inequívocas de que el Zn es un nutriente esencial para los mismos fue obtenida, por primera vez, por Todd et al. (1934), en ratas. Sin embargo, su importancia práctica para los animales de granja no fue reconocida hasta 1955, a partir de los trabajos de Tucker y Salmon, realizados en cerdos. En la actualidad, la deficiencia de Zn continúa siendo importante, tanto en producción vegetal como en producción animal, especialmente en países en vías de desarrollo (Nielsen, 2012), así como también en salud humana (Prasad, 2013; Sandstead, 2013).

La deficiencia de Zn ha sido producida en bovinos, bajo situaciones experimentales y utilizando dietas semisintéticas (Miller y Miller, 1960; Miller y Miller, 1962; Miller et al., 1965b; Ott et al., 1965b). Los informes de casos de deficiencia clínica de zinc en bovinos bajo pastoreo son relativamente escasos. El primero de ellos fue realizado por Legg y Sears (1960) en la Guyana Británica. Posteriormente, Dynna y Havre (1963) informaron también casos en Noruega, y Spais y Papasteriadis (1974) en Grecia.

La deficiencia experimental de Zn fue descrita por primera vez en ovinos por Ott et al. (1964) y en caprinos por Miller et al. (1964). También existen informes de casos de deficiencia clínica de Zn ocurridos naturalmente en ovinos (Pierson, 1966) y en caprinos (McDowell, 1992).

2) Funciones

El Zn cumple un importante rol en el organismo en relación con la actividad de más de 300 metaloenzimas, entre las que se citan: anhidrasa carbónica, glutámico deshidrogenasa, D-glicerilaldehído 3-fosfato deshidrogenasa, alfa-manosidasa, fructosa 1-6 difosfatasa, alcohol deshidrogenasa, FA, carboxipeptidasa, aminolevulínico deshidratasa, retinaldehído reductasa, ADN y ARN polimerasas, timidina quinasa, Cu-Zn superóxido dismutasa y leucotrieno A₄ hidrolasa (Underwood y Suttle, 1999; McCall et al., 2000; Suttle, 2010; Maret, 2013). Por otro lado, se han identificado un número aún mayor de Zn proteínas en las que el metal cumple un fin estructural (por ejemplo, en los motivos “dedos de Zn”). Estas Zn proteínas están involucradas en la diferenciación y proliferación celular, en la transducción de señales, la adhesión celular y en la transcripción del ADN (King, 2011).

Se reconoce, además, su papel como antioxidante (Powell, 2000; Prasad, 2014), en la estabilidad de la membrana plasmática (O'Dell, 2000) y en la regulación de la expresión génica (Cousins et al., 2003; Jackson et al., 2008). De allí su vital papel en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los ácidos nucleicos, en la división celular, la reproducción, el funcionamiento del sistema inmunológico, el metabolismo de la vitamina A, el control de los radicales libres, etc.

3) Deficiencia

Las lesiones características de la piel, a nivel histológico, son para e hiperqueratosis (Norrdin, et al., 1973; Mills, 1978) y dermatitis, especialmente en patas, morro, orejas y alrededor de los ojos (Ott et al., 1965a). También se han descrito disminución del crecimiento del hueso endocondral y periostial y del cartílago epifisario, disminución del porcentaje de cenizas del hueso (Norrdin et al., 1973), hiperplasia epitelial irregular, con espesamiento del estrato córneo en la mucosa de la boca, ausencia de linfocitos T en timo, linfonódulos y bazo (Sanecki et al., 1985), hipertrofia e hiperqueratosis de la mucosa del esófago (Miller y Miller, 1960; Whitenack et al., 1978).

Los signos clínicos de la deficiencia de Zn son: disminución del consumo de alimentos, retardo o cesación del crecimiento, piel engrosada, escamosa y agrietada, pérdida de pelo y lana, fallas reproductivas en machos y hembras, anomalías esqueléticas, dificultosa reparación de heridas, etc. (Mills, 1978; Underwood, 1981; Suttle, 2010).

La disminución o cese del crecimiento causada por la deficiencia de Zn es debida a un menor consumo de alimento, pero también, en parte, a una menor eficiencia de conversión alimenticia (Underwood, 1981). Sommers y Underwood (1969) hallaron una mayor excreción urinaria de N en los corderos deficientes en comparación con los controles pareados por consumo, lo que indica una modificación en el metabolismo de las proteínas. Similares resultados en crecimiento y conversión alimenticia son citados por Miller et al. (1968) en lechones.

Una deficiencia moderada de Zn, caracterizada por menor producción de carne, leche o lana, disminución de la resistencia a infecciones y fertilidad subnormal puede estar más ampliamente distribuida de lo que se pensaba en un principio (Underwood, 1981). En nuestro país, algunos datos de relevamiento así lo parecen indicar (Ruksan, 1985). Nuestro grupo de investigación, en un trabajo de relevamiento realizado en el norte de La Pampa (Pechin et al., 1995), encontró que el contenido promedio de Zn en los pastos en otoño, invierno, primavera y verano era 39,3, 29,0, 20,9 y 27,0 ppm (base Materia Seca). El 53 y el 25% de las muestras en primavera y verano, respectivamente, contenían menos de 20 ppm de Zn. Los requerimientos del mineral de los bovinos para carne fueron fijados en 30 ppm por el NRC (1996), con un rango entre 20 y 40 ppm, en 40-50 ppm para vacas lecheras (NRC, 2001) y entre 20 y 33 ppm para ovinos (NRC, 2007).

La concentración de Zn en suero o plasma es el indicador de deficiencia más ampliamente usado, tanto en humanos (Wieringa et al., 2015) como en animales (Suttle, 2010), pero su especificidad es criticada cuando se considera con criterio diagnóstico. Los niveles normales en animales domésticos están entre 0,8 y 1,2 µg/ml, pero la variabilidad individual puede ser alta y otros factores, además de los niveles de Zn dietario, afectan las concentraciones de Zn sérico (Underwood, 1981), por ejemplo, la edad o las demandas metabólicas. En referencia a esto, animales jóvenes de rápido crecimiento o vacas lactantes sufren rápidos cambios plasmáticos cuando consumen dietas bajas en Zn. Pero, por otro lado, las infecciones, la endotoxemia, el ejercicio extenuante y el estrés térmico, entre otros, pueden producir una redistribución metabólica y la disminución de los valores de Zn en suero (Mills, 1978; Orr et al., 1990; King, 2011), complicando la interpretación de los datos. En condiciones experimentales, por lo tanto, es necesario estandarizar el momento de muestreo y tratar de evitar factores de variación. McDowell (1992) sostiene que, en rumiantes, valores de Zn plasmático por debajo de 0,6 µg/ml pueden considerarse como deficientes, entre 0,6 y 0,8 como marginales y entre 0,8 y 1,2 µg/ml como normales, pero que estas mediciones deberían

combinarse con la determinación del Zn en forrajes, en el caso de estudios de relevamiento. Por otro lado, Suttle (2010) plantea algunas diferencias y fija la banda marginal de deficiencia entre 0,40 y 0,60 $\mu\text{g/ml}$. Generalmente, el tiempo para producir la depleción del mineral en rumiantes es corto (una o dos semanas) cuando se utilizan dietas experimentales muy bajas en Zn (entre 3 y 4 ppm). Sin embargo, con dietas que contienen niveles mayores, se necesita un período más prolongado. Por ejemplo, White et al. (1994) informaron que a los 89 días de experimentación, los corderos alimentados con una dieta que contenía 10 ppm de Zn, tenían niveles séricos del mineral un poco por encima de 0,40 $\mu\text{g/ml}$, pero la producción de lana era menor que en los grupos alimentados con mayores concentraciones de Zn.

Se han identificado varias metaloenzimas Zn dependientes, pero la mayoría de ellas cambia sólo ligeramente en una deficiencia de Zn (Baker y Ammerman, 1995). Sin embargo, la FA sérica disminuye notablemente en la deficiencia de Zn (Miller et al., 1965b) y, a juzgar por los resultados de Spears (1989) en bovinos, parece comportarse mejor que el Zn plasmático. La actividad de esta enzima decae en respuesta a la deficiencia de Zn, pero en condiciones prácticas está sujeta a importantes fluctuaciones e influencias distintas a las del status de Zn, de manera que es difícil establecer rangos razonables que respondan a una adecuada provisión de Zn (Kirchgesner et al., 1993).

Un excelente criterio práctico para el diagnóstico de la deficiencia de Zn es la respuesta al tratamiento, en referencia al consumo de alimento, crecimiento y problemas específicos relacionados con esta deficiencia (Miller, 1970; White, 1992).

Varios trabajos han demostrado que, con la excepción de hueso, páncreas y plasma, los cambios en la concentración tisular de Zn que tienen lugar antes de que se hagan evidentes la reducción en el crecimiento, la falla en el apetito y otras indicaciones de deficiencia de Zn, son de escasa magnitud para ser usados con criterio diagnóstico. Los análisis de pelo pueden ser utilizados para detectar deficiencias crónicas, sólo después de eliminar cualquier tipo de contaminación externa (Mills, 1978). A pesar de que el pelo es una muestra fácil de tomar, presenta algunas variaciones que es preciso considerar (Miller et al., 1965c; Combs et al., 1982), y no siempre refleja fielmente los niveles dietarios de Zn, a juzgar por los trabajos de Beeson et al. (1977). Carcagno et al. (1993), en nuestro país, trabajando con bovinos sanos y con adecuado ritmo de crecimiento, encontraron valores de Zn en pelo de $120,6 \pm 23,61$ ppm.

De manera coincidente, Underwood (1981) señala que, a medida que la deficiencia progresa, el Zn declina más marcadamente en páncreas, pelo y órganos sexuales. Además de los nombrados, en deficiencias severas se han hallado concentraciones bajas de Zn en hueso, hígado y piel (Miller y Miller, 1962; Miller et al., 1966). Sin embargo, la piel no parece ser siempre un tejido sensible a los cambios de Zn dietario (Miller et al., 1965b).

4) Conceptos de biodisponibilidad y biodisponibilidad relativa

Para alcanzar una producción animal eficiente y mantener un normal estado de salud en los animales es necesario que los nutrientes minerales sean provistos en la dieta en cantidades adecuadas y en una forma que sea biológicamente utilizable. En la alimentación de los rumiantes, frecuentemente existen deficiencias minerales que hacen necesario el uso de algún tipo de suplementación mineral. Salvo excepciones puntuales, la forma indicada de la misma es a través de la vía oral, mezclando los suplementos con la dieta completa o proveyendo los mismos en forma separada, en bateas, en el caso de una alimentación pastoril. El grado de biodisponibilidad de los minerales influye en los requerimientos dietarios y es importante, por

lo tanto, conocer esa biodisponibilidad en los alimentos y suplementos minerales que se utilizan comúnmente en la alimentación de los animales.

El término “biodisponibilidad” es definido como la proporción de un nutriente ingerido a partir de una fuente particular que es absorbido en una forma que pueda ser utilizada en los procesos metabólicos normales del animal (Ammerman et al., 1995). Sin embargo, parece razonable dejar esta definición para el término “digestibilidad verdadera” y reservar “biodisponibilidad” para definir la porción del nutriente ingerido que realmente es utilizada a nivel tisular, lo que está de acuerdo con la definición de O’Dell (1984). Para algunos nutrientes, la medición de la utilización es dificultosa, y generalmente se utilizan estimadores de esa utilización que a veces no conciben estrictamente con la definición de biodisponibilidad (Ammerman et al., 1995).

En relación con la identificación de las variables apropiadas para ser utilizadas como criterios en los estudios de biodisponibilidad, Fairweather-Tait (1987) señala, en relación al hierro, pero de una manera que puede ser aplicada al resto de los minerales, lo siguiente:

“Es aparente que la disponibilidad del hierro en cualquier alimento no es una propiedad inherente, característica del material que está siendo ensayado, sino un valor experimentalmente determinado que refleja la absorción y utilización del hierro ingerido bajo las condiciones del test”.

Los valores de biodisponibilidad son frecuentemente expresados como porcentaje en relación a la respuesta obtenida con un material de referencia estándar. Es así que el término correcto, en este caso, es biodisponibilidad relativa (BDR). Este valor es útil en la formulación de raciones cuando se aplica a suplementos minerales, tanto más aún cuando la fuente estándar es la misma, o similar en biodisponibilidad, que la usada para determinar los requerimientos del animal para ese mineral (Ammerman et al., 1995).

5) Métodos para estimar la biodisponibilidad

Se han utilizado varios métodos para estimar la biodisponibilidad de los minerales: absorción aparente, absorción verdadera, retención neta, respuestas en crecimiento, acumulación tisular, niveles de enzimas o compuestos esenciales y retención de isótopos (Ammerman, 1995; Baker y Ammerman, 1995).

La absorción de un elemento mineral puede proveer una estimación de su biodisponibilidad. Se asume entonces que la porción dietaria del mismo que es absorbida a partir del tracto gastrointestinal está disponible para su almacenamiento o los distintos procesos fisiológicos. Sin embargo, esto no siempre es cierto (Ammerman, 1995). Por ejemplo, Seal y Heaton (1983) observaron que el ácido 2-picolínico incrementaba la absorción de Zn en ratas cerca de un 60 %, pero al mismo tiempo incrementaba la excreción urinaria, de manera que no existía cambio en la retención neta. Aunque la absorción era mayor, no había una cantidad mayor de Zn disponible para su uso potencial a nivel tisular.

La absorción aparente o digestibilidad aparente es de valor limitado para aquellos minerales como el Zn en los que la principal vía de excreción es la gastrointestinal.

La absorción verdadera o digestibilidad verdadera descuenta la porción del elemento que ha sido absorbida y subsecuentemente excretada en el tubo gastrointestinal. Esta porción de la excreción fecal total se designa como “excreción fecal endógena total” o “excreción fecal metabólica”. Así se llega a:

Absorción Verdadera: $\frac{\text{consumo} - (\text{excreción fecal total} - \text{excr. fecal metabólica})}{\text{consumo}} \times 100$

El valor (porcentual) de absorción verdadera es mayor que el de absorción aparente y es una estimación más válida de la cantidad del mineral presentado a los tejidos para propósitos metabólicos. Para calcular la excreción fecal metabólica de Zn en ratas se ha utilizado la técnica de dilución de radioisótopos (Weigand y Kirchgessner, 1976; Evans et al., 1979). Miller y Cragle (1965) realizaron estudios de digestibilidad verdadera en bovinos. Weigand y Kirchgessner (1980) determinaron, en un minucioso estudio en ratas, la eficiencia de utilización total verdadera del Zn, calculada como el cociente entre la utilización total y la absorción verdadera.

La retención neta (aparente), llamada “disponibilidad neta” por Underwood (1981) puede definirse como la porción del mineral consumido que es retenida, considerando como pérdidas la excreción total (fecal y urinaria). Se han realizado ensayos de balance químico en corderos para comparar la BDR del Zn en el ZnO y la metionina-Zn (Spears, 1989), aunque los reportes con humanos son mucho más numerosos que con animales (Baker y Ammerman, 1995).

Momcilovic et al. (1975) fueron los primeros en utilizar la concentración de Zn en hueso (fémur) para estimar la biodisponibilidad del Zn en ratas en crecimiento. Ellos encontraron que la regresión del logaritmo de la concentración del Zn en fémur frente a la concentración de Zn dietario produjo una respuesta lineal en un rango más amplio que la ganancia de peso. Esto es posiblemente debido a que los huesos sirven como una reserva movilizable de Zn en las ratas en crecimiento (Baker y Ammerman, 1995), lo que no ha sido demostrado en rumiantes. Por el contrario, Franz et al. (1980) hallaron que la ganancia de peso fue un mejor parámetro que la acumulación en hígado o hueso para estimar la BDR del Zn a partir de varios alimentos en ratas en crecimiento. Sin embargo, Wedekind et al. (1994), en un ensayo con cerdos en crecimiento, encontraron que los niveles de Zn en hueso o plasma han resultado más útiles que la ganancia de peso como estimadores de la BDR. Brugger et al. (2014) también concuerdan con estos resultados en cerdos. En corderos, el Zn en plasma, hígado, riñón y páncreas fueron los parámetros más sensibles (Rojas et al., 1995). Coincidentemente, White et al. (1994), también en corderos, encontraron que el Zn plasmático fue un parámetro más sensible que la ganancia de peso.

Se han identificado varias metaloenzimas Zn dependientes, pero la mayoría de ellas cambia sólo ligeramente en una deficiencia de Zn (Baker y Ammerman, 1995). La FA, a partir de los resultados de Spears (1989) en bovinos, parece comportarse mejor que el Zn plasmático.

La concentración plasmática o tisular de MT aparece como un indicador promisorio del status de Zn (King, 2011). Rojas et al. (1995) hallaron que la concentración de MT en hígado, riñón y páncreas se comportaba tan bien como la concentración de Zn en los mismos tejidos para evaluar la BDR del mineral en corderos.

El método de retención de un isótopo ingerido para estimar la absorción del Zn ha sido descrito por Heth y Hoekstra (1965). El alimento a ser evaluado se marca, extrínseca o intrínsecamente, con ^{65}Zn , luego se administra una dosis oral durante un corto período de tiempo y se mide la radiación corporal total durante un período que permita la determinación de una tasa estable de pérdida del Zn endógeno. Al mismo tiempo, en otro grupo de animales se da ^{65}Zn inyectable y se mide la función exponencial de la tasa de pérdida de radioactividad. Finalmente, se realiza la extrapolación de ambas pendientes a tiempo cero y se estima el

porcentaje de Zn absorbido a partir de la relación entre ambas ordenadas. Una variación de este método utiliza la medición del porcentaje de una dosis oral de ^{65}Zn depositado en determinados tejidos luego de un período de equilibrio. Miller et al. (1968) trabajaron de esta manera con terneros. Aunque esta variación no provee una estimación cuantitativa de la absorción, puede utilizarse para comparaciones cualitativas.

Las fuentes inorgánicas más frecuentemente utilizadas para la suplementación de Zn son óxido, sulfato y, en menor medida, carbonato y cloruro de Zn. Analizando todos los trabajos realizados con monogástricos, en una revisión efectuada por Baker y Ammerman (1995), los autores no observaron una tendencia clara acerca de cuál de las fuentes presenta mayor biodisponibilidad. Sin embargo, a partir de trabajos en aves (Wedekind y Baker, 1990) y cerdos (Hahn y Baker, 1993; Wedekind et al., 1994) surge que el $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o el $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, usados normalmente como estándares, son superiores al ZnO.

En rumiantes (bovinos y ovinos) la tendencia general parece ser: $\text{ZnSO}_4 > \text{ZnO} > \text{ZnCO}_3 > \text{ZnCl}$ (Baker y Ammerman, 1995, Suttle, 2010), aunque, en algunos ensayos, el sulfato no ha sido claramente superior al óxido de Zn (Miller et al., 1970; Kincaid, 1979).

6) Condiciones para un ensayo de biodisponibilidad

Este punto ha sido desarrollado en el Capítulo II, página 59 y 60.

7) Cálculo de la BDR

La biodisponibilidad de un nutriente en una sustancia problema en relación a su biodisponibilidad en una sustancia estándar es usualmente definida como la relación entre las cantidades de las sustancias estándar y problema requeridas para producir una respuesta equivalente. Aunque el concepto es simple, su determinación presenta varios problemas. Algunos de estos problemas son estadísticos e involucran el modelo, el diseño experimental y la estimación. Estos aspectos han sido ampliamente discutidos y puestos al día por Littell y et al. (1995, 1997), y son brevemente expuestos a continuación.

La mayoría de los ensayos de biodisponibilidad usan métodos de regresión. La variable independiente (x) puede ser la cantidad total de nutriente ingerido por el animal o la concentración del nutriente en la dieta. Si el consumo dietario es igual entre los grupos, cualquiera de las dos posibilidades es aceptable. Si los consumos dietarios difieren entre grupos, es necesario relacionar la respuesta al consumo total del nutriente. La variable dependiente (y), es decir la respuesta a ser medida, puede ser la ganancia de peso, la concentración tisular del mineral o la de enzimas dependientes del mismo. En algunos casos, la variable dependiente puede ser transformada logarítmicamente, si la validez del ensayo lo requiere.

El valor de BDR es definido como x_s/x_t , siendo x_s y x_t las cantidades de las sustancias estándar y problema requeridas para producir un valor dado de respuesta y . Para estimar la bondad de ajuste del modelo se utiliza comúnmente R^2 , que es calculado como la suma de cuadrados de la regresión dividida la suma de cuadrados total, y por lo tanto mide la porción de la variación total en la variable dependiente que es debida a su relación con la variable independiente.

El ensayo de relación de pendientes es la forma de ensayo más comúnmente usada en los experimentos de biodisponibilidad recientes. Los valores de las variables independiente (x) y dependiente (y) son determinados para cada unidad experimental. Se asume que hay una relación lineal entre x e y para las distintas fuentes del mineral. Las ecuaciones de regresión lineal son calculadas, $y = a_s + b_s x$ para la fuente estándar e $y = a_t + b_t x$ para la fuente a ser probada. Se asume, posteriormente, que las dos líneas se interceptan al nivel $x = 0$ y que $a_s = a_t$, de modo que el valor común del intercepto puede denominarse simplemente a . Ya

que x_s y x_t denotan las cantidades de las sustancia estándar y probada requeridas para producir valores equivalentes de respuesta y, resulta que $a + b_s x_s = a + b_t x_t$. De modo que: $BDR = x_s/x_t = b_t/b_s$, es decir, la relación entre las pendientes de ambas líneas de regresión. De allí el nombre de ensayo de “relación de pendientes”.

8) Fuentes de Zn y biodisponibilidad

Hace relativamente poco tiempo, la industria comenzó a producir complejos orgánicos de distintos minerales, de los cuales los más utilizados son los proteínatos y aminoatos. Se ha sostenido que su impacto en nutrición animal surge del hecho de que poseen una mejor digestibilidad y a que, una vez absorbidos, determinados complejos aminoácido-mineral podrían ser transportados a tejidos o sistemas enzimáticos específicos (Vandergrift, 1992).

El complejo aminoácido-mineral es definido como el producto resultante a partir de la reacción de una sal soluble del metal en cuestión y un aminoácido. El complejo metionina-Zn es, al presente, el complejo aminoácido-Zn más utilizado en producción animal. Se trata de un compuesto soluble, químicamente estable, eléctricamente neutro y con un peso molecular de 378 daltons (Brown y Zeringue, 1994).

Los estudios sobre los mecanismos que gobiernan la absorción de Zn han sugerido que el Zn puede ser absorbido como parte de un complejo o quelato intacto formado entre el mineral y uno o más ligandos orgánicos. Heinrichs y Conrad (1983), en estudios de crecimiento microbiano *in vitro* hallaron que la metionina-Zn no era degradada por las bacterias ruminales y pasaría, entonces, intacta al tracto digestivo posterior. Ellos utilizaron un medio purificado, libre de nitrógeno (N), con cuatro fuentes de N añadidas: urea, DL-metionina, metionina-Fe y metionina-Zn. El crecimiento de un cultivo puro de *Butyrivibrio fibrisolvens* indicó que ocurrió una escasa o nula utilización de N a partir de los aminoatos. El crecimiento de un inóculo de bacterias del rumen sugirió que la metionina-Fe era degradada en condiciones que simulaban las ruminales, pero que la metionina-Zn no. En el trabajo no se indica si las diferentes fuentes de N tenían iguales proporciones de Fe y Zn. Esta posibilidad debería ser considerada, ya que ciertos metales, particularmente el Zn, pueden inhibir el crecimiento bacteriano (Brown y Zeringue, 1994).

Brown y Zeringue (1994) midieron la solubilidad de distintos proteínatos y aminoatos. La metionina-Zn, a concentraciones que pueden encontrarse en el tracto digestivo a las dosis usuales del producto comercial, presentó altos porcentajes de solubilidad a pH 5 y fue completamente soluble a pH 2. Esto puede representar una ventaja sobre algunas sales inorgánicas de Zn, menos solubles, y explicar la mejor biodisponibilidad encontrada en ciertos ensayos. Por otro lado, el complejo metionina-Zn fue inestable en una solución buffer a los pH mencionados, ya que el aminoácido y el Zn se detectaron separadamente luego de una filtración en gel. Este hallazgo, entonces, entra en contradicción con lo sostenido por la industria, en el sentido de que el complejo metionina-Zn no se absorbería en forma intacta en el intestino. Así, además, se perdería, al menos parcialmente, una de las ventajas esgrimidas en un principio con respecto a que la metionina protege al Zn de la interacción con otros ligandos en el lumen intestinal, que pudieran afectar su absorción. Trabajos anteriores (Hill et al., 1987; Hempe y Cousins, 1989) tampoco habían podido demostrar la absorción intacta del complejo metionina-Zn a través del epitelio intestinal. En otro sentido, la potencia de quelación de las fuentes orgánicas de Zn (aminoatos y proteínatos) también podrían influenciar la digestibilidad y el grado de biodisponibilidad del mineral, y recientemente se ha sugerido que fuentes con grados de quelación moderados tienen mejor BDR que aquellas con grados bajos o demasiado altos (Huang et al., 2009).

De todas maneras, para extraer conclusiones más ajustadas en relación con este tema, es necesaria una mayor investigación acerca de las propiedades físicas y químicas, utilización y metabolismo de los complejos orgánicos, y específicamente de los aminoatos, usados en distintas especies de interés productivo.

Swinkels et al. (1994) sostienen que no existen evidencias consistentes acerca de la mejor biodisponibilidad del Zn en los complejos Zn aminoácidos. Sin embargo, a juzgar por los trabajos realizados en los últimos 15 años, existen algunas diferencias entre especies y, tal vez, entre destinos productivos (carne o leche, por ejemplo).

La aseveración de Swinkels et al. (1994) parece cumplirse, al menos en cerdos. Hill et al. (1986) no hallaron diferencias entre metionina-Zn y sales inorgánicas de Zn cuando se tomaron en cuenta el desempeño productivo y la concentración de Zn plasmático. La metionina-Zn tuvo una biodisponibilidad superior al ZnO, aunque inferior al ZnSO₄, tomando como criterios Zn en plasma y hueso (Wedekind et al., 1994). Hahn y Baker (1993) encontraron que metionina-Zn y ZnSO₄ sostuvieron niveles de Zn plasmático superiores al ZnO, pero similares entre sí. La BDR del Zn a partir de ZnSO₄ y metionina Zn fue similar en lechones (Revy et al., 2002).

A diferencia de los trabajos con cerdos, Wedekind et al. (1992) y Wedekind y Baker (1990) hallaron que la metionina-Zn poseía una mayor biodisponibilidad que el ZnSO₄ y el ZnO, tomando como criterios la concentración de Zn en tibia o la ganancia de peso en pollos.

En ovinos y bovinos en crecimiento, y utilizando como parámetros la ganancia de peso y los niveles plasmáticos de Zn y FA, no se encontraron diferencias entre el ZnO y la metionina-Zn (Spears, 1989). Sin embargo, cuando el mismo autor realizó ensayos de balance químico usando dietas semi-purificadas, el uso de la metionina-Zn resultó en una mayor retención que el ZnO, resultante de coeficientes de absorción aparente similares pero diferentes niveles de excreción urinaria (Spears, 1989). Garg et al. (2008), también citan una mayor retención de Zn en corderos suplementados con metionina-Zn frente a aquellos suplementados con ZnSO₄, pero explicada por una mejor digestibilidad. Rojas et al. (1995), reportaron recientemente que la metionina-Zn presentó similar biodisponibilidad que el ZnO y el ZnSO₄ en corderos a juzgar por la concentración de Zn en determinados órganos, pero que la lisina-Zn fue superior a las demás fuentes probadas, logrando concentraciones de Zn superiores en páncreas, hígado y riñón. Contrariamente a estos resultados, Kegley y Spears (1994) hallaron que la suplementación de corderos, alimentados con heno de festuca, con ZnO y ZnSO₄ mejoró la ganancia de peso y la conversión alimenticia, comparados con los grupos Basal y metionina-Zn. En rumiantes en crecimiento, la información acerca del uso de metionina-Zn, hasta el presente, aparece como contradictoria y serían necesarios ensayos más ajustados para determinar su biodisponibilidad.

En el único trabajo realizado con vacas de cría, los animales suplementadas con metionina-Zn destetaron terneros más pesados y ganaron más peso que los suplementados con ZnO (Spears y Kegley, 1991).

Sin embargo, el uso de metionina-Zn en vacas lecheras aparece como más promisorio, con respuestas que parecen explicadas por su mayor biodisponibilidad. Los primeros trabajos de Kincaid et al. (1984) ya señalaban que las respuestas en producción de leche y disminución en el número de células somáticas en leche eran mejores para metionina-Zn que para ZnO. Kellogg (1990) resume los resultados de 8 ensayos con 492 vacas lecheras comparando el uso de metionina-Zn con la suplementación con cantidades similares de Zn bajo la forma de ZnO. En estos ensayos, la suplementación con metionina-Zn incrementó la producción de

leche en un 4,8 %, con una reducción significativa de la incidencia de afecciones podales. Similares hallazgos fueron citados en un trabajo realizado en nuestro país (Corbellini et al., 1997): el uso de metionina-Zn produjo un aumento en la producción de leche del orden del 5,4 %, mejoró los parámetros reproductivos y redujo el recuento de células somáticas en leche y la incidencia de enfermedades podales, con respecto a la dieta basal. Las respuestas observadas con ZnO fueron menores y no significativas, con la excepción de algunos parámetros reproductivos (vacas con partos distócicos y vacas con endometritis post-parto o al servicio), que mejoraron cuando se compararon con el grupo alimentado con la dieta basal. En estos parámetros reproductivos no hubo diferencias entre las dos fuentes de Zn.

Es necesario tener una mirada crítica cuando se evalúan los ensayos que comparan fuentes orgánicas e inorgánicas de Zn. En primer lugar, y como lo señala Suttle (2010), las ocasionales ventajas halladas en algunos ensayos pueden reflejar la baja calidad de la fuente inorgánica grado alimentación utilizada para la comparación antes que el valor intrínseco del complejo orgánico. Muchos ensayos han utilizado ZnO como fuente patrón. En monogástricos, la BDR del ZnSO₄ es superior a la del ZnO, dependiendo la magnitud de la diferencia del parámetro utilizado en la comparación (Wedekind y Baker, 1990; Wedekind et al., 1992; Edwards y Baker, 1999). Por otro lado, la variación de la BDR entre los distintos orígenes (o fabricantes) es mayor en el caso del ZnO que en el caso del ZnSO₄ (Edwards y Baker, 1999). Por estas razones, parece aconsejable que la fuente patrón para realizar comparaciones sea el ZnSO₄, tanto en monogástricos como en rumiantes (Cao et al., 2000).

En segundo lugar, varios ensayos han comparado fuentes orgánicas con fuentes inorgánicas de Zn sin la utilización de un grupo alimentado con una dieta no suplementada (por ejemplo, Whitaker et al., 1997; Malcolm-Callis et al., 2000; Gunter et al., 2001), evitando la cuestión de si la suplementación con Zn era o no necesaria.

En tercer lugar, otros ensayos de BDR han usado un grupo Basal con niveles que cubrirían largamente los requerimientos de Zn, y cantidades crecientes de Zn a dosis farmacológicas de distintas fuentes del mineral (Wedekind et al., 1992; Cao et al., 2000). La acumulación tisular de Zn, un parámetro comúnmente empleado, está indicando en este caso que se han superado los mecanismos de control homeostático, y los datos de BDR hallados podrían no reflejar lo que sucede con dosis en rangos más bajos.

Hipótesis

La BDR del Zn a partir de la fuente orgánica probada (complejo Zn aminoácidos) es mayor que en el caso de la fuente patrón inorgánica (ZnSO₄).

El efecto de cantidades crecientes de Zn a partir de distintas fuentes difiere según los parámetros de evaluación de las funciones metabólicas utilizados, lo cual llevaría a definir posiblemente diferentes valores de BDR para distintas funciones metabólicas.

Objetivos

a) Objetivo general

Estimar la BDR del Zn en el complejo Zn aminoácidos (Availa Zinc 10, Zinpro Corporation, USA) con respecto al ZnSO₄ para ovinos en crecimiento.

b) Objetivos particulares

Estudiar el efecto de la deficiencia de Zn sobre la ganancia de peso, la producción de lana, el balance de Zn y de N, y sobre parámetros bioquímicos y de concentración tisular relacionados con el metabolismo del Zn.

Examinar una posible interacción Zn-Cu, a través de la medición del balance de Cu, los niveles de Cu plasmático y las diferentes concentraciones tisulares del mismo.

Estudiar la BDR del Zn en el complejo Zn aminoácidos con respecto a la fuente patrón, utilizando para ello los parámetros que responden a suplementación con Zn en el modelo desarrollado.

Materiales y Métodos

Veinte corderos de raza Corriedale, con un peso aproximado de 15 kg fueron asignados en forma aleatoria, estratificando por peso inicial, a cinco grupos: Basal (dieta con 10 ppm de Zn), suplementados con ZnSO₄·H₂O para proveer niveles adicionales de Zn de 10 y 20 ppm y suplementados con Availa-Zn 100 (Zinpro Corporation, USA) para proveer también niveles adicionales de 10 y 20 ppm. De esta manera, quedaron conformados 5 grupos de 4 corderos cada uno, para realizar un ensayo de BDR: Basal (10 ppm Zn), S10 (20 ppm Zn), S20 (30 ppm Zn), A10 (20 ppm Zn) y A20 (30 ppm Zn). La composición de la dieta basal fue similar a la descrita en el Capítulo II. El alimento se administró en forma restringida, a razón del 2,5 % del peso, cantidad que fue dividida en tres porciones y proporcionada cada día a las 8, 13 y 19 horas.

Los corderos fueron alojados en jaulas de plástico, de 1 m x 0,5 m, con piso ranurado. Se procedió con un período de destete y acostumbramiento de dos semanas. Durante la primera semana, los animales fueron alimentados con cebadilla criolla, cortada y ofrecida en estado fresco, a voluntad, más una ración molida de grano de maíz (85 %) y pellet de girasol (15%), a razón del 1 % del peso. Durante la segunda semana de acostumbramiento, la dieta anterior fue suplantada, paulatinamente, por la dieta de cada grupo experimental, hasta llegar a un nivel del 2,5 % de peso vivo, base materia seca.

Al inicio del ensayo, momento en el que los corderos tenían un peso promedio de 15,255 kg \pm 1,729 kg, se esquiló un área de 80 cm², del flanco de cada cordero, con el objeto de medir el crecimiento de la lana en ambos grupos. Los animales se pesaron mensualmente, para evaluar la evolución de la ganancia de peso. También mensualmente, fueron sangrados de vena yugular y se extrajeron dos muestras de sangre con distintos anticoagulantes (heparina y EDTA sódico). Las muestras obtenidas con heparina fueron centrifugadas a 2.000 rpm,

durante 10 minutos, y el plasma sobrenadante se separó en dos submuestras. Una submuestra se utilizó para la posterior medición de los niveles de Zn y Cu. En la segunda submuestra de plasma se midió la actividad de FA. A partir de una segunda muestra de sangre (EDTA sódico como anticoagulante) se realizó la determinación del número de leucocitos y de linfocitos, variables hematológicas que, a partir de los resultados presentados en el Capítulo II, podían presentar algún grado de respuesta a la suplementación con Zn. A los 45 días (primer período) y durante la última semana del trabajo (segundo período) se realizaron sendos ensayos de balance de Zn, de Cu y de N. Durante el período de balance (5 días) se midió el alimento consumido por cada animal y la producción de heces y de orina, las que se recogieron diariamente. Se tomó una alícuota diaria de cada excreta (30 gr para heces y 20 ml para orina), y se guardaron a - 20 °C hasta su análisis. A partir de estos datos, se calculó la cantidad de Zn, Cu (mg/día) y N (g/día) retenidos diariamente por cada animal.

Al finalizar el ensayo (6 meses de duración), se cortó la lana de las áreas previamente delimitadas. Las muestras se pesaron para medir la producción de lana. Una muestra fue enviada al laboratorio para la medición de las concentraciones de Zn y Cu por EAA (en ppm, base MS). Se procedió al sacrificio de los animales por exanguinación. Luego del mismo, se recogieron muestras de músculo (longissimus dorsi, supraescapular y semimembranoso), hígado, páncreas, testículo, riñón, pulmón y hueso (metacarpo y metatarso) para la determinación de los niveles de Zn y Cu.

Las muestras de tejidos blandos fueron cortadas en trozos de 1 cm³ y secadas en estufa de flujo continuo a 100 °C hasta peso constante. Luego, se procedió al molido de las mismas y se tomó una submuestra de 500 mg de cada tejido. Cada submuestra fue sometida a una digestión ácida con una mezcla de 2 ml ácido nítrico (HNO₃, 68 % V/V), 2 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 98 % V/V) y 2 ml de ácido perclórico (HClO₄, 70 % V/V). Una vez terminado el proceso de digestión se llevó a un volumen de 25 ml, utilizando agua deionizada.

Las muestras de alimento y heces fueron secadas a 100 °C y molidas en un molino a martillo tipo Resch. Luego de obtener una submuestra de 500 mg de cada una, se procedió de acuerdo a lo descripto para tejidos blandos.

Las muestras de hueso fueron desengrasadas con acetona, durante 48 hs, enjuagadas con agua deionizada y llevadas a una mufla a 500 °C, durante 5 hs. De las cenizas obtenidas, se pesaron 500 mg y se procedió a tratamiento ácido y dilución como se describió previamente.

Las muestras de lana fueron lavadas con una solución de agua bidestilada y detergente neutro. Luego de enjuagadas repetidas veces con agua deionizada, fueron secadas a 60°C. Una submuestra de 500 mg de cada una fue sometida a digestión ácida y dilución, para su posterior análisis.

Las determinaciones de Zn y Cu fueron realizadas por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA), utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 5100 PC (Perkin Elmer, 1996), por medio de las técnicas de Allan (1961) y de Piper y Higgins (1967). Los resultados se expresaron en ppm, base MS, en el caso de los sólidos y en µg/ml en el caso de los líquidos.

Para la determinación de FA en plasma se utilizó el método colorimétrico cinético propuesto por Wiener Laboratorios (Rosario, Argentina), que usa como reactivo al p-nitrofenil fosfato. Para tal fin, se empleó un Autoanalizador Technicom RA100, con lectura a 405 nm de longitud de onda. Los resultados fueron expresados en unidades internacionales (UI)/L.

El N total de alimento, heces y orina fue determinado por la técnica semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1990). Los resultados se expresaron en porcentaje, base MS, en los dos primeros casos, y en mg/L en el caso de la orina.

Análisis estadístico: Las variables medidas repetidamente a lo largo del ensayo: ganancia diaria de peso, concentración de Zn, Cu y FA en plasma, y número de leucocitos y linfocitos en sangre, fueron analizadas con el paquete estadístico SAS, utilizando un modelo mixto de mediciones repetidas, de acuerdo a Littell et al. (1998). Se utilizó como término de error animal dentro de tratamiento. Se probaron distintas estructuras de covarianza y la que presentó el mejor ajuste, de acuerdo al criterio de Akaike y al criterio bayesiano de Schwartz, fue la estructura de covarianza autoregresiva de orden 1 para varianzas homogéneas (AR1). El modelo incluyó tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento x tiempo. Los tratamientos fueron analizados utilizando un test de Tukey para comparación de medias.

Para el resto de los parámetros medidos una sola vez (producción de lana) o dos veces en el ensayo (balance de N, Zn y Cu) se utilizó un análisis de varianza de una vía, y un test de Tukey para comparación de medias. Se realizaron contrastes ortogonales “a priori”, en el caso de ser necesarios, y análisis de contrastes polinomiales para detectar respuestas lineales (3 niveles: basal, + 10 ppm Zn y + 20 ppm Zn) en cada fuente de Zn. También se realizaron contrastes ortogonales y polinomiales, cuando fueron necesarios, en el caso de las variables medidas a lo largo del tiempo.

Finalmente, a cada una de las variables que respondieron en forma lineal en las dos fuentes se les realizaron los análisis regresión en forma independiente para cada fuente y, posteriormente, un análisis de relación de pendientes para determinar la BDR, de acuerdo a Littell et al. (1991, 1997). La BDR se expresó como porcentaje: $BDR = (b_1/b_2) \times 100$.

Resultados

Tal como se puede apreciar en la Tabla III.1 y en la Figura III.1, la ganancia de peso de los corderos, en este modelo experimental, no fue afectada por la deficiencia de Zn, así como tampoco lo fue la producción de lana. Si bien en la Figura III.1 puede apreciarse visualmente que la ganancia de peso del grupo Basal tendió a disminuir en el mes 6 del ensayo, este parámetro no difirió significativamente ($p = 0,1019$) del resto de los grupos, probablemente debido a un coeficiente de variación muy grande.

Los niveles de Zn plasmático fueron menores en el grupo Basal, los que mostraron además una tendencia lineal decreciente a lo largo del ensayo ($p < 0,01$), pero no se detectaron diferencias entre niveles de Zn suplementados ni entre fuentes de Zn (Tabla III.2 y Figura III.2).

La variable Cu plasmático no difirió entre grupos (Tabla III.2 y Figura III.3). Tampoco se hallaron diferencias entre grupos en los niveles de FA plasmática, ni el número de leucocitos y linfocitos en sangre (Tabla III.3 y Figuras III.4, III.5 y III.6). Similarmente, los tratamientos no tuvieron efecto sobre la Digestibilidad Aparente de la MS (Tablas III.4 y III.8).

La cantidad de N aparentemente digerido fue similar, pero la retención de N en el primer período fue menor en el grupo Basal que en los tratados (Tabla III.5). Sin embargo, no hubo diferencias entre concentraciones de Zn suplementario y fuentes. Este resultado se repitió sólo parcialmente en el segundo período (Tabla III.9).

En ambos períodos medidos, la cantidad de Zn aparentemente digerido y la retención de Zn, mostraron una respuesta lineal (Tablas III.6 y III.10) ante el incremento en la cantidad del mineral, pero la respuesta fue similar en ambas fuentes.

La digestibilidad aparente del Zn y la retención de Zn (como porcentaje del Zn ingerido) fueron mayores en el grupo Basal (contrastes ortogonales Basal vs tratamientos, $p < 0,05$) sólo en el segundo período medido (Tablas III.6 y III.10).

La excreción de Zn por orina fue menor en los dos grupos suplementados con Availa Zn 100, pero, también, sólo durante el segundo período de recolección (Tabla III.10).

La concentración de Zn en hígado de los grupos con los mayores niveles de suplementación (sin diferencias entre fuentes) fue mayor que la concentración en el grupo Basal. Los niveles de Zn en hueso (metacarpo y metatarso), riñón y páncreas en los corderos del grupo Basal difirieron significativamente de todos o de la mayoría de los grupos suplementados, pero no hubo diferencias entre las distintas concentraciones de Zn ni entre fuentes. En pulmón, testículo y músculo no se hallaron diferencias entre grupos (Tabla III.12). La concentración de Zn en lana del grupo Basal sólo difirió significativamente con el grupo A20 (test de Tukey), pero cuando se realizaron los contrastes ortogonales “a priori”, el grupo Basal fue significativamente menor ($p < 0,05$) que los tratamientos.

No pudieron demostrarse efectos del Zn sobre la retención de Cu (Tablas III.7 y III.11), a diferencia del ensayo presentado en el Capítulo II, en el cual la suplementación con Zn (a razón de 30 ppm) disminuyó la cantidad de Cu aparentemente digerido en un período.

En relación con este punto, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en la concentración de Cu, en ninguno de los tejidos investigados, aún con una suplementación de 20 ppm de Zn (Tabla III.13), a excepción de Cu en lana, en cuyo caso hubo un efecto lineal decreciente.

Para la determinación de la BDR del Zn a partir del complejo Zn aminoácidos en comparación con $ZnSO_4$ fueron elegidas las cinco variables que respondieron, en las dos fuentes, con incrementos lineales al aumento de la dosis de Zn. Las mismas fueron: Zn aparentemente digerido (períodos 1 y 2), retención de Zn (períodos 1 y 2) y Zn hepático (Tabla III.14). En las Figuras 3.7 a 3.11 se grafica la regresión de cada una de estas variables en función de la concentración de Zn suplementario en la dieta.

Luego de realizar el análisis de BDR, se observó en los cinco casos que la pendiente del complejo Zn aminoácidos fue numéricamente mayor que la de la fuente patrón (BDR entre 105 y 125), pero las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla III.1. Ganancia de peso y producción de lana en los cinco grupos (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Ganancia de peso (kg)	2,725 \pm 1,537	4,025 \pm 1,040	3,450 \pm 1,805	4,075 \pm 1,489	3,075 \pm 2,327	0,75
Producción de lana sucia (g) ^x	11,20 \pm 1,54	11,10 \pm 1,20	12,93 \pm 2,95	13,90 \pm 3,67	12,15 \pm 0,72	0,41

^x en 80 cm².

Tabla III.2. Niveles de Zn y Cu en plasma (valores expresados como promedio \pm DE de las 7 mediciones a lo largo del ensayo).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Zn en plasma ($\mu\text{g/ml}$) ^{CO}	0,629 \pm 0,100 ^a	1,061 \pm 0,129 ^b	0,968 \pm 0,060 ^b	0,986 \pm 0,123 ^b	1,061 \pm 0,088 ^b	<0,001
Cu en plasma ($\mu\text{g/ml}$)	0,943 \pm 0,075	0,886 \pm 0,067	0,882 \pm 0,053	0,900 \pm 0,031	0,896 \pm 0,180	0,902

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey).

Tabla III.3. Niveles de fosfatasa alcalina en plasma y número de leucocitos y linfocitos en sangre (valores expresados como promedio \pm DE de las 7 mediciones a lo largo del ensayo).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
FA en plasma (UI/L)	199,83 \pm 67,29	243,58 \pm 67,32	235,42 \pm 72,06	219,78 \pm 86,85	229,54 \pm 106,32	0,936
Leucocitos (N°/ml de sangre)	7.092,86 \pm 732,02	6.353,57 \pm 311,54	7.041,07 \pm 360,10	6.357,14 \pm 770,10	6.435,71 \pm 548,78	0,199
Linfocitos (N°/ml de sangre)	3.275,96 \pm 354,06	3.162,75 \pm 449,19	3.368,68 \pm 321,26	3.049,50 \pm 360,83	3.460,57 \pm 483,18	0,624

Tabla III.4. Digestibilidad aparente de la MS, primer período (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Consumo de MS (g/d)	273 \pm 3,46	273 \pm 3,46	273 \pm 3,46	273 \pm 3,36	273 \pm 3,46	---
Excreción de MS (g/d)	53,68 \pm 2,41	56,33 \pm 3,40	53,03 \pm 1,83	56,48 \pm 3,70	56,84 \pm 3,74	0,31
MS Aparentemente digerida (g/d)	219,32 \pm 4,58	216,42 \pm 0,80	219,98 \pm 4,96	216,52 \pm 4,44	216,42 \pm 0,92	0,48
Digestibilidad aparente de la MS (%)	80,331 \pm 0,99	79,374 \pm 0,99	80,57 \pm 0,86	79,312 \pm 1,32	79,189 \pm 1,12	0,26

Tabla III.5. Balance de N, primer período (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Consumo de N (g/d)	7,058 \pm 0,009	7,058 \pm 0,009	7,058 \pm 0,009	7,058 \pm 0,009	7,058 \pm 0,009	---
Excreción de N en heces (g/d)	0,955 \pm 0,191	0,850 \pm 0,020	0,858 \pm 0,045	1,028 \pm 0,090	0,960 \pm 0,011	0,096
N Aparentemente digerido (g/d)	6,103 \pm 0,199	6,208 \pm 0,023	6,200 \pm 0,050	6,030 \pm 0,098	6,098 \pm 0,018	0,123
Digestibilidad aparente del N (%)	86,469 \pm 2,721	87,953 \pm 0,289	87,844 \pm 0,648	85,432 \pm 1,297	86,399 \pm 0,170	0,099
Excreción de N en orina (g/d) ^{CO}	1,885 \pm 0,231 ^a	0,865 \pm 0,047 ^b	0,888 \pm 0,105 ^b	0,624 \pm 0,481 ^b	0,470 \pm 0,289 ^b	<0,001
Retención de N (g/d) ^{CO}	4,218 \pm 0,075 ^a	5,343 \pm 0,041 ^b	5,312 \pm 0,128 ^b	5,405 \pm 0,503 ^b	5,628 \pm 0,279 ^b	<0,001
Retención de N (%) ^{CO}	59,766 \pm 1,103 ^a	75,705 \pm 0,662 ^b	75,261 \pm 1,764 ^b	76,582 \pm 7,066 ^b	79,745 \pm 4,034 ^b	<0,001

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey).

^{CO} Contrastes ortogonales, Basal vs tratamientos ($p < 0,05$).

Tabla III.6. Balance de Zn, primer período (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Consumo de Zn (mg/d)	2,730 \pm 0,035	5,460 \pm 0,069	8,190 \pm 0,104	5,460 \pm 0,069	8,190 \pm 0,104	---
Excreción de Zn en heces (mg/d)	1,404 \pm 0,107 ^a	2,665 \pm 0,190 ^b	4,184 \pm 0,585 ^c	2,366 \pm 0,260 ^b	3,778 \pm 0,380 ^c	<0,01
Zn Aparentemente digerido (mg/d)	1,326 \pm 0,138 ^a	2,795 \pm 0,214 ^b	4,006 \pm 0,689 ^{cL}	3,094 \pm 0,245 ^b	4,412 \pm 0,436 ^{cL}	<0,05
Digestibilidad aparente del Zn (%)	48,544 \pm 4,498	51,172 \pm 3,614	48,842 \pm 7,792	56,670 \pm 4,596	53,847 \pm 4,940	0,206
Excreción de Zn en orina (mg/d)	0,095 \pm 0,030	0,081 \pm 0,033	0,080 \pm 0,038	0,095 \pm 0,061	0,149 \pm 0,096	0,448
Retención de Zn (mg/d) ^{co}	1,231 \pm 0,139 ^a	2,714 \pm 0,224 ^b	3,926 \pm 0,709 ^{cL}	2,999 \pm 0,295 ^b	4,263 \pm 0,365 ^{cL}	<0,05
Retención de Zn (%)	45,050 \pm 4,637	49,697 \pm 3,864	47,859 \pm 8,062	54,939 \pm 5,572	52,034 \pm 4,083	0,157

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey).

^L Respuesta lineal, dentro de cada fuente de Zn.

^{co} Contrastes ortogonales, Basal vs tratamientos ($p < 0,05$).

Tabla III.7. Balance de Cu, primer período (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Consumo de Cu (mg/d)	2,73 \pm 0,035	2,73 \pm 0,035	2,73 \pm 0,035	2,73 \pm 0,035	2,73 \pm 0,035	---
Excreción de Cu en heces (mg/d)	1,060 \pm 0,179	1,206 \pm 0,350	1,313 \pm 0,124	1,200 \pm 0,198	1,209 \pm 0,097	0,577
Cu Aparentemente digerido (mg/d)	1,670 \pm 0,150	1,524 \pm 0,330	1,417 \pm 0,156	1,530 \pm 0,171	1,521 \pm 0,064	0,511
Digestibilidad aparente del Cu (%)	61,238 \pm 6,142	55,883 \pm 12,580	51,873 \pm 5,103	56,089 \pm 6,820	55,757 \pm 3,003	0,544
Excreción de Cu en orina (mg/d)	0,169 \pm 0,058	0,153 \pm 0,026	0,123 \pm 0,026	0,190 \pm 0,121	0,173 \pm 0,053	0,689
Retención de Cu (mg/d)	1,502 \pm 0,199	1,370 \pm 0,324	1,294 \pm 0,176	1,340 \pm 0,284	1,349 \pm 0,068	0,758
Retención de Cu (%)	55,070 \pm 7,795	50,261 \pm 12,295	47,362 \pm 5,885	49,165 \pm 10,833	49,413 \pm 2,833	0,771

Tabla III.8. Digestibilidad aparente de la MS, segundo período (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Consumo de MS (g/d)	353,44 \pm 16,82	353,44 \pm 16,82	353,44 \pm 16,82	353,44 \pm 16,82	353,44 \pm 16,82	---
Excreción de MS (g/d)	78,15 \pm 1,79	89,34 \pm 4,76	78,58 \pm 9,18	83,30 \pm 9,38	79,81 \pm 10,36	0,27
MS Aparentemente digerida (g/d)	275,28 \pm 16,27	264,09 \pm 19,64	274,86 \pm 17,93	270,13 \pm 25,68	273,62 \pm 22,86	0,93
Digestibilidad aparente de la MS (%)	77,857 \pm 0,99	74,655 \pm 2,23	77,744 \pm 2,60	76,304 \pm 3,70	77,340 \pm 3,55	0,48

Tabla III.9. Balance de N, segundo período (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Consumo de N (g/d)	9,048 \pm 0,431	9,048 \pm 0,431	9,048 \pm 0,431	9,048 \pm 0,431	9,048 \pm 0,431	---
Excreción de N en heces (g/d)	1,281 \pm 0,172	1,361 \pm 0,109	1,155 \pm 0,126	1,375 \pm 0,239	1,311 \pm 0,237	0,487
N Aparentemente digerido (g/d)	7,767 \pm 0,353	7,687 \pm 0,530	7,893 \pm 0,522	7,673 \pm 0,658	7,737 \pm 0,550	0,977
Digestibilidad aparente del N (%)	85,861 \pm 1,606	84,892 \pm 1,882	87,180 \pm 1,835	84,690 \pm 3,315	85,462 \pm 2,958	0,623
Excreción de N en orina (g/d)	1,899 \pm 0,366 ^a	1,171 \pm 0,306 ^b	1,334 \pm 0,501 ^{ab}	1,162 \pm 0,260 ^b	0,960 \pm 0,615 ^b	<0,05
Retención de N (g/d)	5,868 \pm 0,396	6,516 \pm 0,489	6,559 \pm 1,002	6,511 \pm 0,675	6,777 \pm 0,361	0,361
Retención de N (%)	64,861 \pm 3,339	71,978 \pm 3,225	72,238 \pm 7,804	71,852 \pm 4,697	75,064 \pm 5,875	0,138

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey).

Tabla III.10. Balance de Zn, segundo período (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Consumo de Zn (mg/d)	3,534 \pm 0,168	7,069 \pm 0,336	10,603 \pm 0,505	7,069 \pm 0,336	10,603 \pm 0,505	---
Excreción de Zn en heces (mg/d)	1,306 \pm 0,187 ^a	3,470 \pm 0,578 ^b	5,969 \pm 0,320 ^c	3,735 \pm 0,438 ^b	5,076 \pm 0,271 ^c	<0,01
Zn Aparentemente digerido (mg/d)	2,228 \pm 0,314 ^a	3,599 \pm 0,894 ^b	4,634 \pm 0,703 ^c	3,333 \pm 0,603 ^b	5,527 \pm 0,636 ^c	<0,05
Digestibilidad aparente del Zn (%)	62,872 \pm 6,400 ^a	50,569 \pm 0,308 ^b	43,567 \pm 4,763 ^b	47,021 \pm 6,937 ^b	52,018 \pm 3,872 ^b	<0,05
Excreción de Zn en orina (mg/d)	0,077 \pm 0,032 ^a	0,061 \pm 0,015 ^a	0,0856 \pm 0,027 ^a	0,009 \pm 0,005 ^b	0,022 \pm 0,005 ^b	<0,05
Retención de Zn (mg/d) ^{CO}	2,151 \pm 0,325 ^a	3,538 \pm 0,896 ^b	4,579 \pm 0,708 ^{CL}	3,324 \pm 0,606 ^b	5,505 \pm 0,637 ^{CL}	<0,05
Retención de Zn (%) ^{CO}	60,692 \pm 6,886 ^a	49,702 \pm 10,365 ^{ab}	43,044 \pm 4,864 ^b	46,893 \pm 6,992 ^{ab}	51,810 \pm 3,885 ^{ab}	<0,05

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey).

^L Respuesta lineal, dentro de cada fuente de Zn.

^{CO} Contrastes ortogonales, Basal vs tratamientos (p<0,05).

Tabla III.11. Balance de Cu, segundo período (valores expresados como promedio \pm DE).

Variable	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Consumo de Cu (mg/d)	3,534 \pm 0,168	3,534 \pm 0,168	3,534 \pm 0,168	3,534 \pm 0,168	3,534 \pm 0,168	---
Excreción de Cu en heces (mg/d)	1,307 \pm 0,325	1,434 \pm 0,448	1,767 \pm 0,257	1,471 \pm 0,501	1,438 \pm 0,196	0,500
Cu Aparentemente digerido (mg/d)	2,228 \pm 0,220	2,101 \pm 0,549	1,767 \pm 0,379	2,063 \pm 0,642	2,096 \pm 0,300	0,679
Digestibilidad aparente del Cu (%)	63,221 \pm 7,776	59,150 \pm 14,064	49,774 \pm 8,719	57,903 \pm 15,987	59,159 \pm 6,392	0,560
Excreción de Cu en orina (mg/d)	0,165 \pm 0,081	0,146 \pm 0,024	0,116 \pm 0,047	0,100 \pm 0,042	0,175 \pm 0,113	0,509
Retención de Cu (mg/d)	2,062 \pm 0,201	1,955 \pm 0,548	1,652 \pm 0,390	1,963 \pm 0,631	1,921 \pm 0,315	0,751
Retención de Cu (%)	58,483 \pm 6,486	55,037 \pm 14,34	46,519 \pm 9,277	55,110 \pm 15,812	54,242 \pm 7,287	0,657

Tabla III.12. Concentración de Zn en órganos (ppm, base MS; valores expresados como promedio \pm DE).

Órgano	Basal	S10	S20	A10	A20	P
músculo semimembranoso	74,25 \pm 6,45	70,00 \pm 12,52	77,75 \pm 5,32	74,00 \pm 13,74	76,75 \pm 6,65	0,810
músculo supraescapular	89,56 \pm 27,71	104,38 \pm 32,28	113,50 \pm 36,90	104,25 \pm 32,88	91,80 \pm 17,24	0,782
músculo longissimus dorsi	61,00 \pm 10,55	66,25 \pm 9,32	72,50 \pm 8,89	70,25 \pm 33,15	67,00 \pm 3,92	0,887
Riñón ^{CO}	48,25 \pm 10,69 ^a	76,00 \pm 14,76 ^b	73,50 \pm 9,15 ^b	82,75 \pm 6,85 ^b	76,75 \pm 13,74 ^b	<0,01
Pulmón	56,50 \pm 8,66	62,25 \pm 8,34	70,50 \pm 8,81 ^L	72,63 \pm 6,65	70,50 \pm 11,15	0,096
Hígado ^{CO}	61,75 \pm 17,95 ^a	93,38 \pm 11,09 ^{ab}	103,75 \pm 27,75 ^{bl}	98,50 \pm 15,72 ^{ab}	103,50 \pm 14,26 ^{bl}	<0,05
Testículo	60,25 \pm 6,34	68,50 \pm 14,62	64,50 \pm 8,85	69,00 \pm 5,72	66,55 \pm 1,75	0,612
Páncreas ^{CO}	51,00 \pm 7,35 ^a	74,75 \pm 12,04 ^b	72,00 \pm 8,04 ^b	64,73 \pm 10,21 ^{ab}	72,93 \pm 4,57 ^b	<0,05
Metacarpo ^{CO}	85,55 \pm 12,689 ^a	160,18 \pm 18,36 ^b	159,75 \pm 31,98 ^b	182,00 \pm 27,18 ^b	185,43 \pm 34,42 ^b	<0,01
Metatarso ^{CO}	83,25 \pm 14,22 ^a	187,05 \pm 42,11 ^b	175,13 \pm 30,13 ^b	166,05 \pm 18,61 ^b	187,63 \pm 51,49 ^b	<0,01
Lana ^{CO}	67,75 \pm 7,14 ^a	85,00 \pm 4,55 ^{ab}	81,00 \pm 13,24 ^{ab}	84,50 \pm 10,54 ^{ab}	88,50 \pm 6,45 ^{bl}	<0,05

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey).

^L Respuesta lineal, dentro de cada fuente de Zn. ^{CO} Contrastes ortogonales, Basal vs tratamientos (p<0,05).

Tabla III.13. Concentración de Cu en órganos (ppm, base MS; valores expresados como promedio \pm DE).

Órgano	Basal	S10	S20	A10	A20	P
Músculo semimembranoso	6,49 \pm 2,88	6,43 \pm 1,72	5,54 \pm 1,38	5,30 \pm 1,15	6,35 \pm 1,20	0,813
Músculo supraescapular	6,95 \pm 3,13	6,88 \pm 2,91	6,05 \pm 1,78	4,68 \pm 0,47	5,83 \pm 0,79	0,561
Músculo longissimus dorsi	4,88 \pm 0,85	5,28 \pm 1,45	6,15 \pm 0,99	5,45 \pm 0,61	5,93 \pm 0,94	0,713
Riñón	12,55 \pm 1,41	13,05 \pm 2,37	12,00 \pm 1,08	13,28 \pm 1,71	12,73 \pm 0,71	0,809
Pulmón	12,60 \pm 1,69	11,55 \pm 1,54	13,28 \pm 0,51	13,10 \pm 1,31	12,63 \pm 1,80	0,508
Hígado	300,06 \pm 170,97	332,00 \pm 48,08	330,25 \pm 38,89	314,75 \pm 72,50	287,75 \pm 146,17	0,972
Testículo	7,90 \pm 1,73	9,13 \pm 2,46	7,23 \pm 1,56	6,98 \pm 0,61	8,78 \pm 1,37	0,321
Páncreas	6,04 \pm 1,45	6,00 \pm 1,09	6,78 \pm 1,88	7,33 \pm 1,42	7,35 \pm 1,00	0,495
Metacarpo	9,55 \pm 0,80	9,10 \pm 0,90	9,43 \pm 0,70	9,56 \pm 1,39	9,60 \pm 1,54	0,967
Metatarso	9,68 \pm 0,91	9,60 \pm 0,42	9,73 \pm 0,71	9,53 \pm 0,39	9,73 \pm 0,46	0,987
Lana ^{CO}	6,33 \pm 0,62 ^a	5,25 \pm 0,33 ^b	4,63 \pm 0,25 ^{bL}	5,08 \pm 0,10 ^b	4,75 \pm 0,21 ^{bL}	<0,01

Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey).

^L Respuesta lineal, dentro de cada fuente de Zn. ^{CO} Contrastes ortogonales, Basal vs tratamientos (p<0,05).

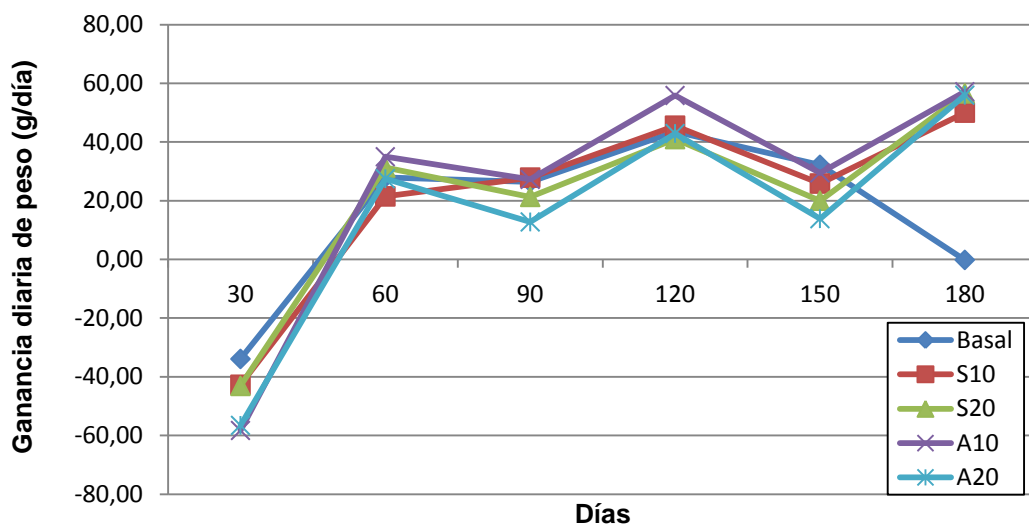


Foto III.1. Ensayo de balance, donde pueden verse las bandejas para recolección de heces y orinas.



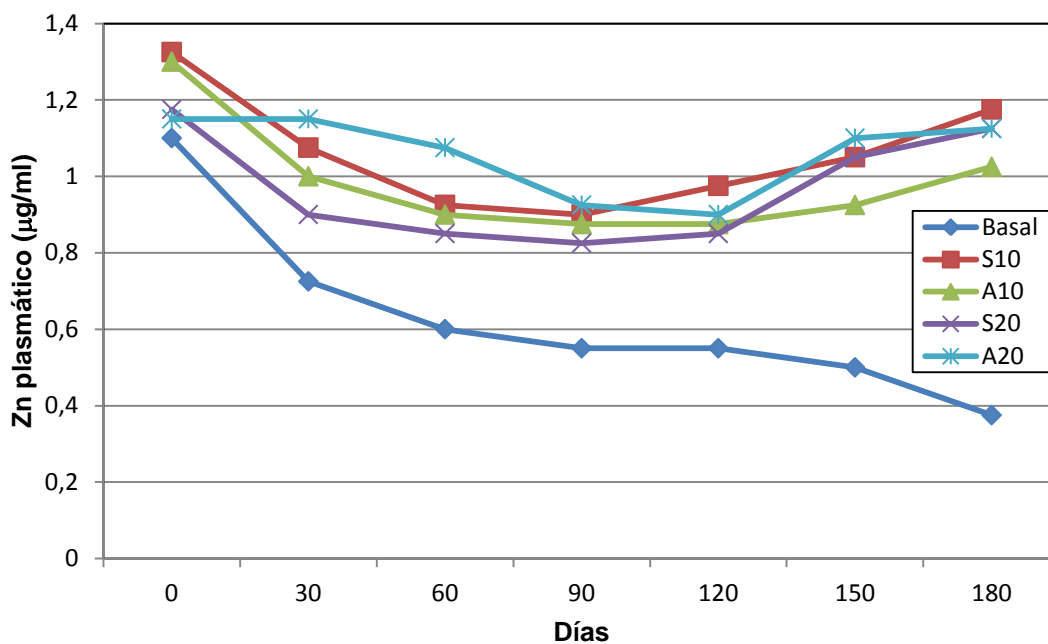
Foto III.2. Vista panorámica de las jaulas metabólicas, al momento del ensayo de balance. Las heces quedan encima de un tejido de plástico, tipo mosquitero, colocado por encima de cada bandeja. El nylon negro permite una recolección más fácil y limpia del alimento rechazado y de las heces que puedan caer fuera de las bandejas.

Figura III.1. Evolución de la ganancia diaria de peso en los cinco grupos experimentales.



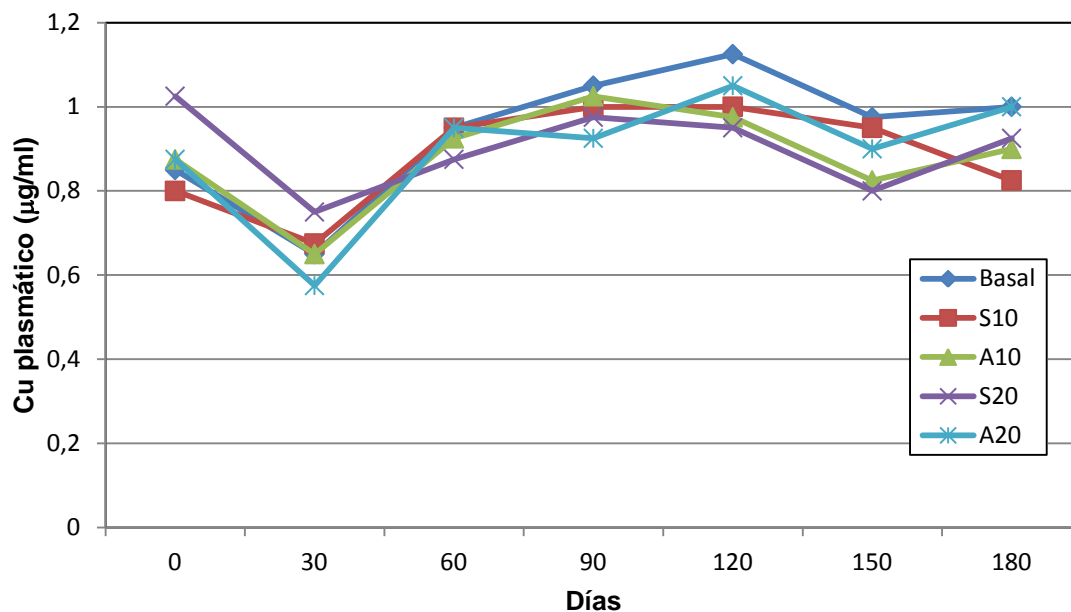
Efecto tiempo: $p < 0,01$. Efecto tratamiento e interacción tratamiento x tiempo: NS.

Figura III.2. Evolución de los niveles de Zn plasmático en los cinco grupos experimentales.



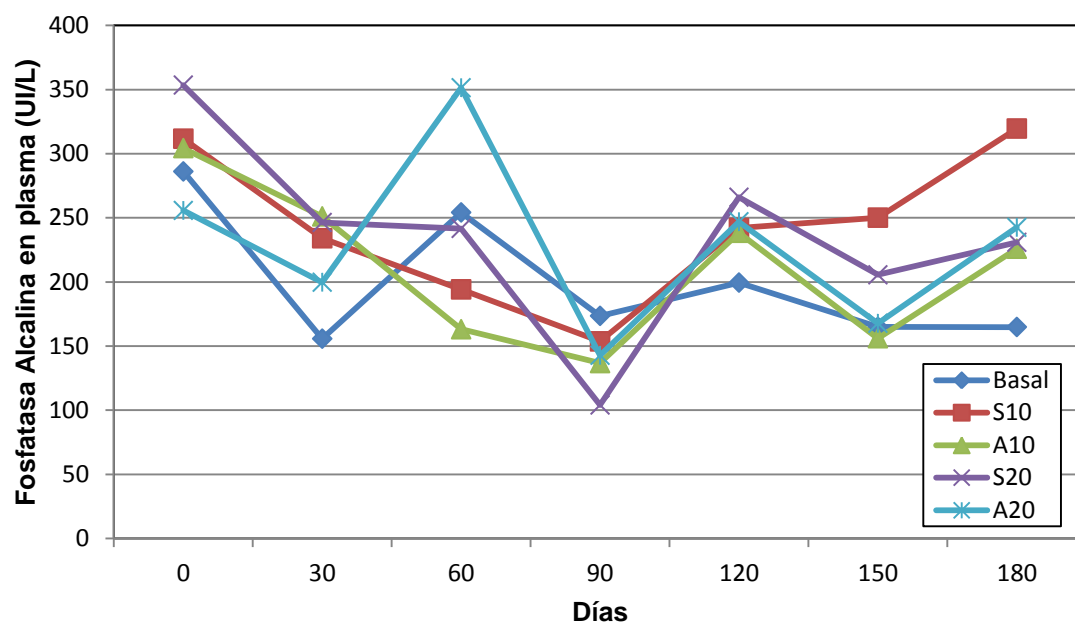
Efectos tratamiento y tiempo: $p < 0,01$. Interacción tratamiento x tiempo: NS. Basal versus resto de los tratamientos ($p < 0,001$). Efecto tiempo lineal en el grupo Basal ($p < 0,01$).

Figura III.3. Evolución de los niveles de Cu plasmático en los cinco grupos experimentales.



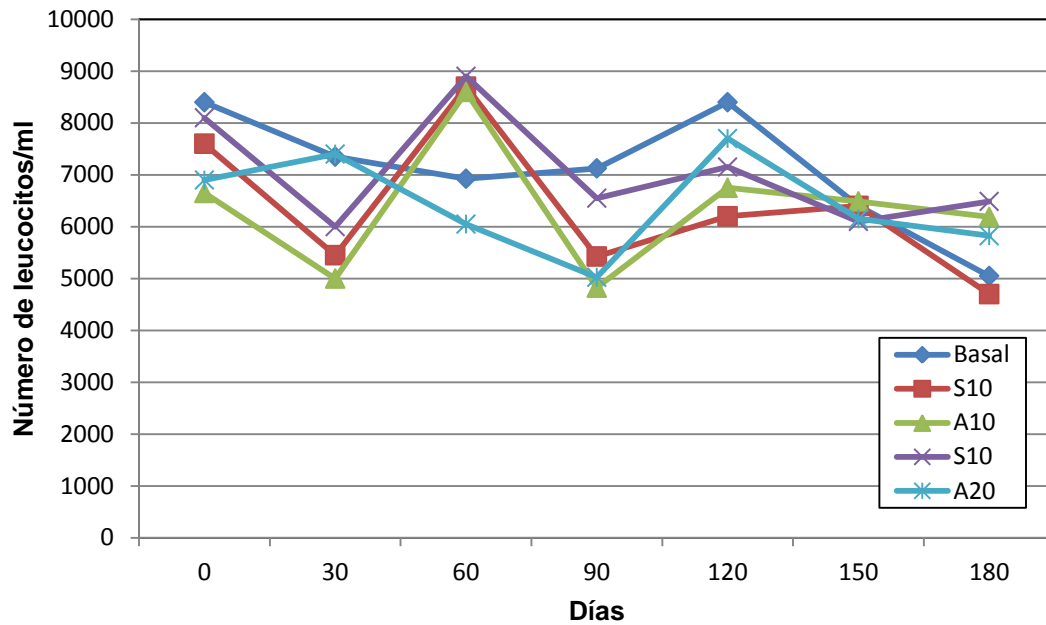
Efecto tiempo: $p < 0,01$. Efecto tratamiento e interacción tratamiento x tiempo: NS.

Figura III.4. Evolución de los niveles de fosfatasa alcalina plasmática en los cinco grupos experimentales.



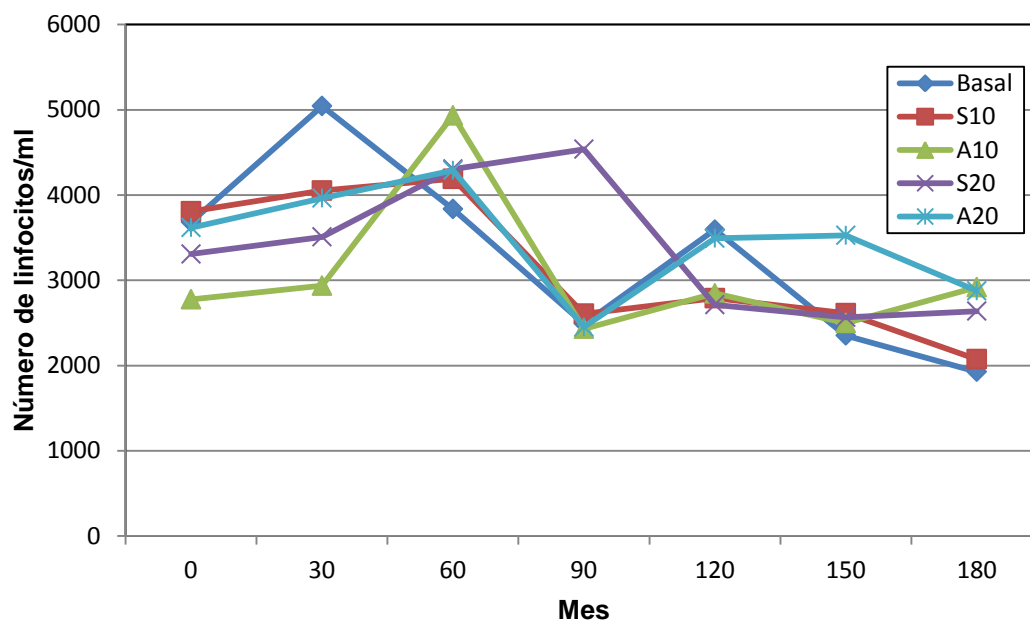
Efecto tiempo: $p < 0,01$. Efecto tratamiento e interacción tratamiento x tiempo: NS.

Figura III.5. Evolución del número de leucocitos en sangre en los cinco grupos experimentales.



Efecto tiempo: $p < 0,01$. Efecto tratamiento e interacción tratamiento x tiempo: NS.

Figura III.6. Evolución del número de linfocitos en sangre en los cinco grupos experimentales.



Efecto tiempo: $p < 0,01$. Efecto tratamiento e interacción tratamiento x tiempo: NS.

Figura III.7. Regresión del Zn aparentemente digerido en función del nivel de Zn suplementario en la dieta (primer período).

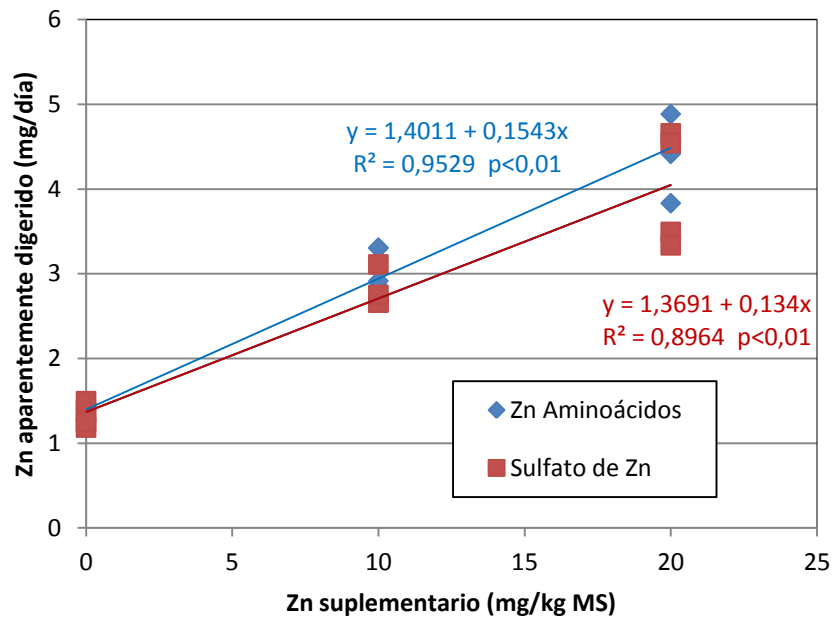


Figura III.8. Regresión del Zn aparentemente digerido en función del nivel de Zn suplementario en la dieta (segundo período).

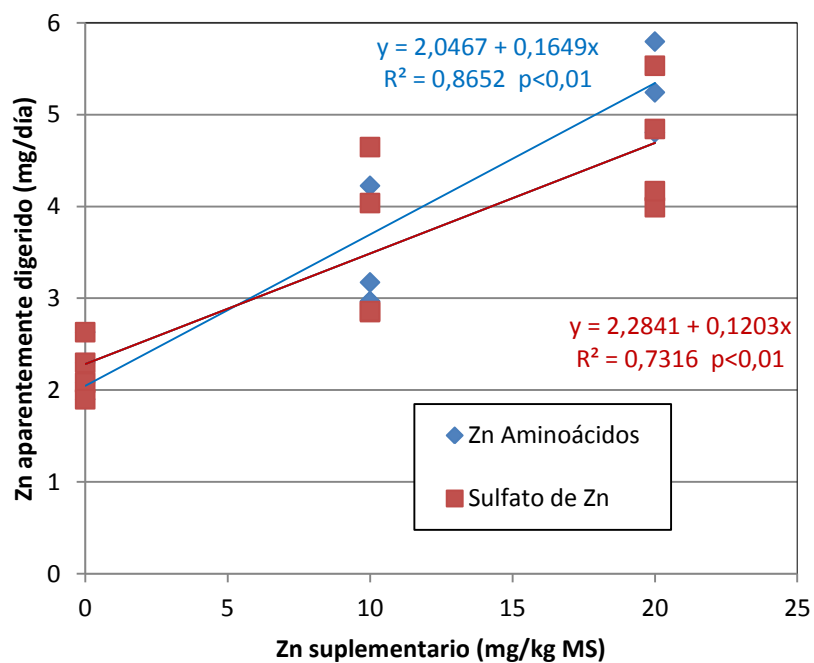


Figura III.9. Regresión de la Retención de Zn en función del nivel de Zn suplementario en la dieta (primer período).

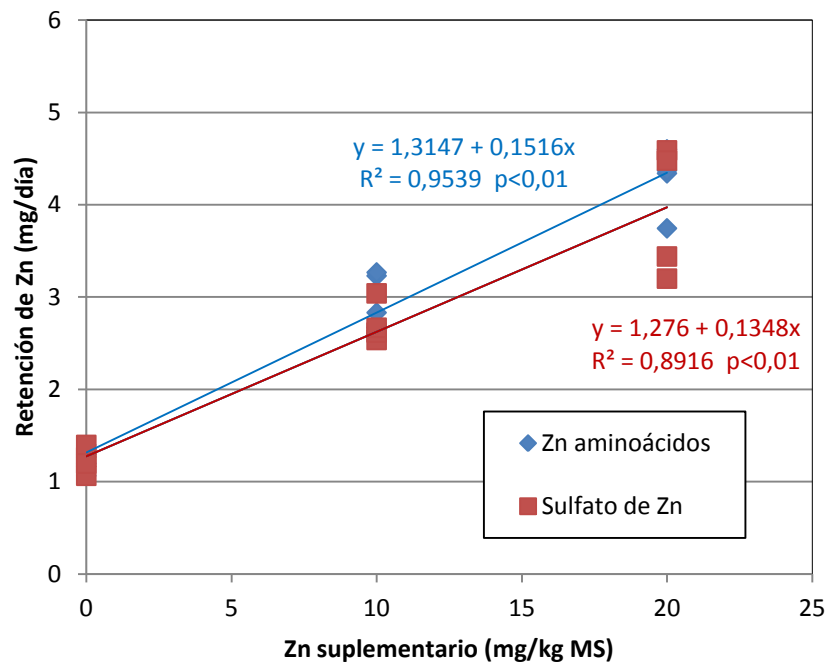


Figura III.10. Regresión de la Retención de Zn en función del nivel de Zn suplementario en la dieta (segundo período).

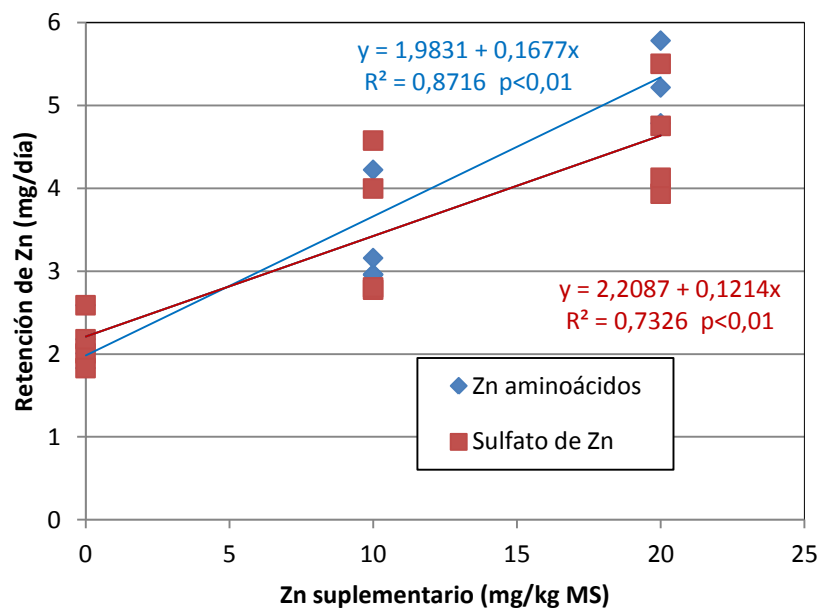


Figura III.11. Regresión de la concentración de Zn en hígado en función del nivel de Zn suplementario en la dieta.

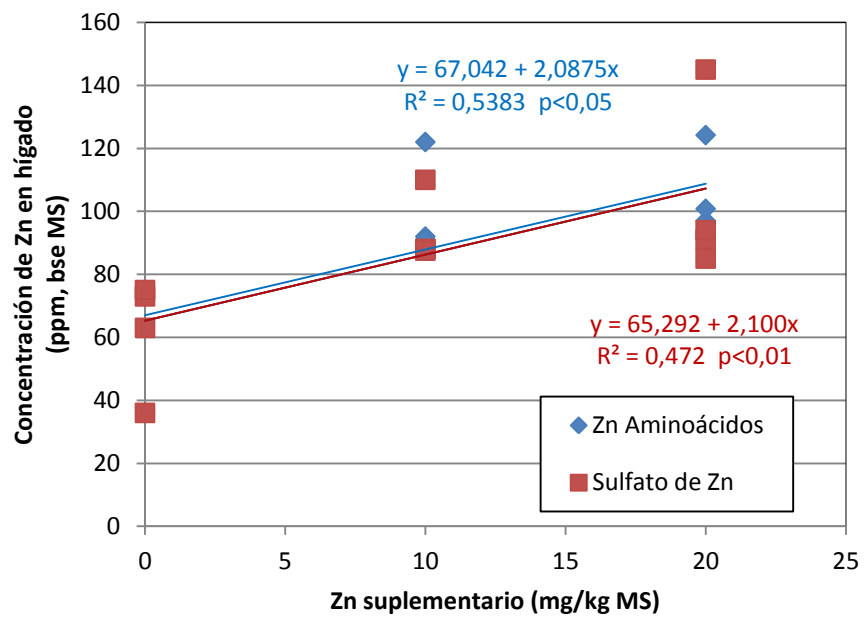


Tabla III.14. Biodisponibilidad relativa del complejo Zn aminoácidos (Zn Aás) en comparación con sulfato de zinc ($ZnSO_4$) estimada a partir del análisis de relación de pendientes de las variables Zn aparentemente digerido, retención de Zn y concentración de Zn en hígado.

Variable dependiente	R^2 general	Intercepto común	Pendientes		EE	BDR Zn Aás vs $ZnSO_4$	Comparación de pendientes (P)
			$ZnSO_4$	Zn Aás			
Zn Ap. digerido (mg/día)							
Primer período	0,901	1,4271	0,1305	0,1527	0,013	117	0,7913
Segundo período	0,767	2,1206	0,1301	0,1605	0,022	123	0,0983
Retención de Zn (mg/día)							
Primer período	0,897	1,3415	0,1308	0,1500	0,013	114	0,8966
Segundo período	0,773	2,0565	0,1305	0,1633	0,022	125	0,1049
Zn en hígado (ppm)	0,411	69,32	1,8582	1,9507	0,627	105	0,7724

Discusión

La discusión de los resultados obtenidos cubre dos aspectos. En primer lugar, el efecto de la dieta Basal cuando se compara con el resto de los tratamientos. En segundo lugar, la posibilidad de detectar diferencias en la biodisponibilidad del Zn entre las fuentes probadas.

Las variables ganancia de peso y producción de lana no fueron modificadas por el consumo de la dieta Basal. Los episodios de acidosis que afectaron indistintamente a individuos de los diferentes grupos contribuyeron a consumos menores que los esperados y obraron como factor limitante para mayores aumentos de peso. No obstante, en ensayos similares (White et al., 1994), éste no fue un parámetro sensible a la suplementación con Zn, ya que los grupos alimentados con dietas con 10, 17 y 27 ppm de Zn tuvieron evoluciones de peso similares entre sí. Debido a la importancia del consumo de alimento sobre la producción animal y al impacto de la deficiencia de Zn sobre el consumo, futuros ensayos deberían contemplar la inclusión de dietas que posibiliten la expresión de un mayor consumo de MS.

La ausencia de efecto sobre la producción de lana contrasta con el trabajo de White et al. (1994), en el cual esta fue afectada por concentraciones dietarias de Zn por debajo de 17 ppm. En el mismo sentido, en un ensayo realizado con anterioridad (Capítulo II), en el cual se compararon un grupo deficiente y un grupo suplementado con 30 ppm de Zn, a partir de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se halló una diferencia del 37 % en producción de lana. Las discrepancias entre los resultados de ambos ensayos podrían deberse, al menos en parte, al menor consumo de alimento (en relación al peso vivo) observado en el segundo ensayo, lo que pudo significar una limitante para una posible respuesta ante la suplementación con Zn.

Como se observó en trabajos realizados con ovinos (Ott et al., 1965b; White et al., 1994) y con distintas especies de animales domésticos (Suttle, 2010), en el presente trabajo el Zn plasmático fue un indicador muy sensible frente a la disminución del Zn dietario. Además, mostró una tendencia lineal decreciente en el grupo Basal a lo largo del transcurso del ensayo, sobre todo a partir de los 120 días del experimento, lo que puede significar que los animales, al final del mismo, habrían acumulado un período de depleción de 60 días.

En el ensayo anteriormente citado (Capítulo II) se hallaron mayores diferencias en Zn plasmático, pero con menores valores absolutos, entre el grupo Basal y el grupo suplementado.

Spears (1989), en un ensayo con corderos, planteó un período de depleción de 42 días, aunque ya a los 14 días halló que la suplementación con Zn (tanto ZnO como metionina Zn) mejoró los niveles de Zn plasmático y a los 28 días los de FA plasmática. Sin embargo, en ese trabajo, la dieta Basal contenía niveles sensiblemente más bajos de Zn (2,8 ppm, base MS) y cada grupo suplementado sólo la adición de 5 ppm de Zn. Los valores de Zn plasmático promedio fueron de 0,24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el grupo Basal y de 0,44 y 0,39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en los grupos ZnO y metionina Zn, respectivamente. Es posible, entonces, que en estos rangos compatibles con deficiencia de Zn, la concentración de Zn plasmático y los niveles de FA plasmática se correlacionen mejor. La respuesta en ambos parámetros a la suplementación con Zn, pero sin diferencia entre fuentes (ZnSO_4 y un complejo Zn aminoácidos), también es citada en cerdos alimentados con una dieta deficiente, que produjo paraqueratosis (Swinkels et al., 1996). Aunque no existen datos comparables en ovinos, Engle et al. (1997) encontraron en terneras alimentadas con heno con un contenido de Zn de 17 ppm, que la suplementación con Zn pudo incrementar los niveles de Zn y FA plasmáticos. Por otro lado, el coeficiente de variación promedio demasiado elevado (35,5 %) de la FA en nuestro ensayo (comparado, por ejemplo

con el del Zn plasmático, 11 %) puede haber conspirado contra la detección de diferencias entre tratamientos, al igual que lo citado en el Capítulo II.

Aunque la deficiencia de Zn afecta distintos indicadores de la inmunidad celular y humoral (Shankar y Prasad, 1998; Fraker et al., 2000, Haase y Rink, 2013), la mayoría de la evidencia se encuentra en trabajos con monogástricos (ratas). La deficiencia severa de Zn afectó el número de linfocitos en lechones (Miller et al., 1968), pero no se han encontrado trabajos similares en ovinos. En nuestro ensayo, con niveles de 10 ppm de Zn en la dieta basal, no pudo apreciarse un efecto de la suplementación sobre el número de leucocitos y linfocitos circulantes, al igual que los resultados presentados en el Capítulo II.

La falta de efecto de la dieta Basal sobre la digestibilidad aparente de la MS está en concordancia con la bibliografía sobre el tema en rumiantes (Miller et al., 1966; Somers y Underwood, 1969) y con ensayos anteriores (Capítulo II).

La mayor excreción urinaria y la menor retención de N en el grupo Basal, y, en consecuencia, la respuesta a la suplementación con Zn, observadas en el ensayo de balance del período inicial, se relacionan con el importante papel que juega el Zn en la síntesis proteica y en la eficiencia de utilización del N absorbido, de manera similar a lo hallado por Somers y Underwood (1969). En el ensayo de balance del período final, si bien la cantidad de N retenido no fue significativamente menor en el grupo Basal, se verificó una mayor excreción de N por orina, lo que respalda la hipótesis de una menor eficiencia de utilización de los aminoácidos absorbidos en los animales deficientes.

El hecho de que la Digestibilidad aparente del Zn (como %) y el porcentaje de Zn retenido presenten diferencias significativas entre el grupo Basal y los tratamientos sólo en el segundo período puede estar indicando que los mecanismos homeostáticos que se ponen en marcha en como ajuste a una disminución del Zn dietario necesitan, posiblemente, un cierto lapso de tiempo para expresarse. De todas maneras, esto contrasta con el trabajo presentado en el Capítulo II, en el que hubo diferencias significativas entre el grupo Basal y el Suplementado, en ambos períodos.

Los resultados observados a nivel tisular coinciden con la bibliografía, especialmente en lo referido a los efectos de la deficiencia de Zn sobre la concentración del mismo en hígado (Ott et al., 1965b; Miller et al., 1968) y hueso (Hoekstra et al., 1967; Swenerton y Hurley, 1968; Suttle, 2010), pero, además alientan la investigación acerca de algunos órganos (como páncreas y riñón) que, generalmente, no son considerados en el diagnóstico de la deficiencia de Zn. Existen evidencias de que la deficiencia de Zn puede afectar la concentración del mineral en estos dos últimos órganos, pero los niveles dietarios usados fueron extremadamente bajos y los animales tenían signos clínicos claros de la deficiencia (Ott et al., 1964; Miller et al., 1966).

La falta de efecto del uso de la dieta Basal sobre la concentración del mineral en músculo, pulmón y testículo fue similar a la hallada en el ensayo del Capítulo II. A pesar de que representa un pool importante de Zn, se ha encontrado que la concentración de Zn en músculo no cambia en animales deficientes (Jackson et al., 1982; Giuliano y Millward, 1984). Con respecto a los otros dos órganos, la información es algo contradictoria. La concentración de Zn en pulmón ha descendido en cabritos y terneros con deficiencia clínica de Zn, mientras que en riñón esto sólo sucedió en los primeros (Miller et al., 1966). Se han hallado menores concentraciones de Zn en testículos de animales deficientes en algunos ensayos con rumiantes (Underwood y Somers, 1969), pero no en otros (Miller et al., 1966).

La concentración de Zn en lana no tuvo la sensibilidad suficiente para detectar diferencias claras entre fuentes ni dosis de Zn, pero la comparación del grupo Basal versus los cuatro grupos suplementados en conjunto permitió hallar diferencias significativas. Estos resultados contrastan con los de White et al. (1994) en los que sólo se hallaron diferencias en este parámetro (medido a los 89 días de ensayo) entre los corderos alimentados con 4 y 10 ppm de Zn, pero no entre este último grupo y aquellos con dietas con mayores concentraciones.

A diferencia de lo que sucedió en el ensayo del Capítulo II, la ausencia de efecto de la suplementación de Zn sobre los niveles de Cu en suero e hígado, los indicadores del metabolismo del Cu más comúnmente usados (Suttle, 2010), revelan que no existe interacción Zn-Cu, al menos a estos bajos niveles de suplementación. Sin embargo, la concentración de Cu en lana descendió linealmente en forma significativa a medida que aumentaba la concentración dietaria de Zn. Si se compara el nivel alcanzado con la dieta Basal, el descenso fue del 17 % con la adición de 10 ppm de Zn y del 37 % con la adición de 20 ppm de Zn (considerando el promedio de ambas fuentes, en cada caso). No existen antecedentes de que la concentración de Cu en lana sea un indicador más sensible del metabolismo del Cu, pero fue el único parámetro medido que mostró alguna respuesta negativa a la suplementación con Zn.

A partir de los resultados del balance de Zn en ambos períodos, en nuestro trabajo, y debido a las respuestas a la suplementación con las dos fuentes de Zn, las variables Zn aparentemente digerido y retención de Zn (mg/d), en el primer y en el segundo período de balance, al igual que la concentración hepática de Zn, aparecen como parámetros adecuados para probar la BDR del Zn, ya que responden linealmente ante el incremento de la concentración de dicho mineral.

En nuestro ensayo, los valores de BDR del Zn orgánico probado varían de acuerdo al parámetro utilizado para su determinación. A pesar de que el análisis estadístico no permite avalar la conclusión acerca de una mayor BDR del complejo Zn aminoácidos, puede apreciarse una tendencia (NS) a favor de la fuente orgánica hacia el final del ensayo utilizando las dos variables del balance de Zn (Zn aparentemente digerido y retención de Zn). Los coeficientes de variación (entre el 12 y el 20 %) no parecen exageradamente altos, considerando este tipo de parámetros, pero las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas en ninguna de las cinco variables probadas, es decir aquellas en las cuales hubo una respuesta lineal en ambas fuentes. Por esta razón, probablemente un mayor número de repeticiones podría haber disminuido el valor crítico para la comparación de las pendientes, y haber mejorado la posibilidad de detección de diferencias. No obstante, esto transita un terreno especulativo, y deben planearse nuevos ensayos para someter a prueba esta hipótesis.

No existe abundancia de trabajos científicos llevados a cabo con este complejo Zn aminoácidos (Availa Zn, Zinpro Corporation) en rumiantes, y que sean adecuados para contrastar con nuestros resultados. Un experimento realizado con novillos en feedlot (Malcolm-Callis et al., 2000), en el que se comparó la adición de 30 ppm de Zn a partir de 3 fuentes (ZnSO₄, Zn aminoácidos y Zn polisacáridos), careció de grupo Basal, y sus hallazgos no pudieron sostener diferencias entre fuentes, al menos en lo referido a desempeño productivo, características de la res y Zn sérico. En un ensayo con novillos a pastoreo y en feedlot, que también careció de grupo Basal, Gunter et al. (2001) no hallaron diferencias entre ZnSO₄ y Zn aminoácidos en ganancia de peso, conversión alimenticia y Zn sérico. Los resultados de Nayeri et al. (2014) indican que la adición de un complejo de Zn aminoácidos, en comparación con Zn inorgánico (sulfato de Zn), puede mejorar la concentración de

inmunoglobulinas totales en el calostro, pero los efectos sobre producción y composición de leche parecen inconsistentes.

Kegley et al. (2001) hallaron pequeñas ventajas en el uso del complejo Zn aminoácidos en terneros. Sólo se encontraron mayores títulos séricos como respuesta a la vacunación contra virus sincicial respiratorio bovino, pero no en el caso de la vacunación contra rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea vírica bovino, así como ninguna diferencia en parámetros productivos.

En el único ensayo con corderos realizado con una metodología similar a la nuestra, pero con concentraciones farmacológicas de Zn, que llegaron a 1.400 ppm (Cao et al., 2000), no pudieron demostrarse diferencias entre $ZnSO_4$ y un quelato Zn aminoácidos. Se evaluaron las concentraciones de Zn en hígado, riñón y páncreas, y los niveles de MT hepática, y los valores de BDR para Zn aminoácidos fueron de 103, 113, 114 y 111, respectivamente, aunque, al igual que en nuestro ensayo, estos no fueron estadísticamente significativos.

Probablemente, en monogástricos, y, especialmente en aves, existan diferencias entre ambas fuentes. Contrariamente a lo hallado en rumiantes, la BDR de un complejo Zn aminoácidos similar al utilizado en nuestro ensayo (Availa Zn, Zinpro Corporation), fue un 64 % superior a la fuente patrón ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) cuando se utilizó como parámetro la concentración de Zn en tibia en pollos parrilleros (Star et al., 2012). En este caso los animales consumieron una dieta basal con 33,5 ppm de Zn (con adición de fitasas), a la que se le adicionaron 5, 10 y 15 ppm de Zn con ambas fuentes.

Conclusiones

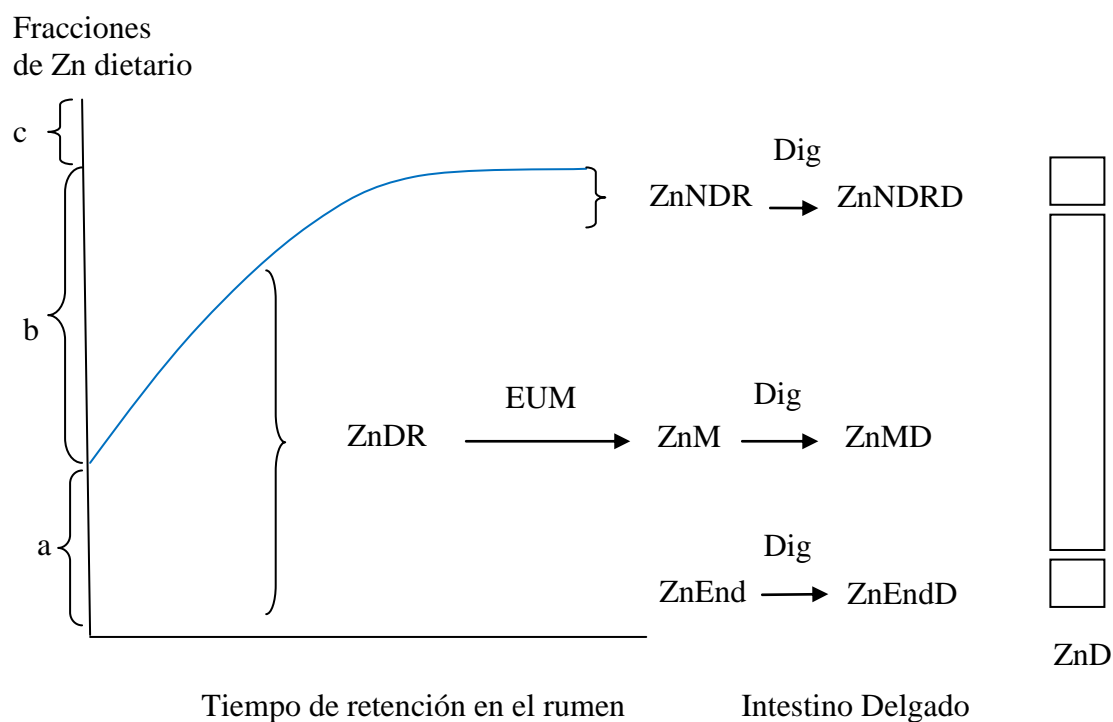
Dentro de las condiciones de nuestro ensayo, puede concluirse que:

- La dieta Basal de Zn administrada a corderos durante 180 días produjo una reducción progresiva de los niveles de Zn plasmático desde el primer mes. Estos niveles resultaron significativamente diferentes a los de los corderos suplementados con las dos fuentes de Zn.
- La concentración hepática de Zn y la cantidad de Zn aparentemente absorbida y retenida reflejaron los distintos niveles dietarios de Zn para las dos fuentes utilizadas. La utilización de estas variables posibilitó el cálculo de la BDR.
- Otros tejidos y anexos (hueso, riñón, páncreas y lana) mostraron diferencias significativas en la concentración de Zn entre el grupo alimentado con la dieta Basal y los grupos suplementados con Zn. En el caso de la lana, se vio respuesta lineal a la suplementación con Zn sólo en el grupo suplementado con la fuente orgánica de Zn.
- No pudo demostrarse fehacientemente una interacción Zn-Cu con este tipo de dietas, ya que sólo una de las variables relevantes exploradas (concentración de Cu en lana) mostró una respuesta lineal significativa ante el incremento de Zn dietario.
- La BDR del complejo Zn aminoácidos parece similar a la del $ZnSO_4$ grado alimentación, utilizada como fuente patrón, aunque algunas tendencias halladas ameritan la realización de futuros ensayos.

Capítulo IV: Discusión general

En la actualidad, el enfoque de los nutricionistas se orienta a cubrir los requerimientos de minerales de manera que optimicen la producción y minimicen el efecto sobre el medio ambiente. Esto debe lograrse con un cálculo ajustado de los requerimientos, con una estimación adecuada del aporte de Zn dietario disponible y con el uso juicioso de fuentes suplementarias. Los enfoques más modernos para el cálculo de requerimientos dietarios de Zn en bovinos lecheros (NRC, 2001) y en rumiantes menores (NRC, 2007) utilizan el método factorial. Este método consiste en calcular un requerimiento diario de Zn absorbible a partir de la suma de los requerimientos de mantenimiento y de producción. Una vez obtenida esa cantidad de Zn (en mg/día) se divide por un coeficiente de absorción (promedio para distintas dietas) y se obtiene un requerimiento dietario de Zn/día. Cuando ese requerimiento diario se divide por el consumo estimado de MS, se obtiene una recomendación referida a la concentración dietaria del mineral (en ppm o mg/kg de MS). El coeficiente de absorción de 0,15 utilizado por el NRC (2001) se basa principalmente en el trabajo de Miller y Cragle (1965), quienes hallaron valores de absorción verdadera de 12 % en terneros de 5 a 12 meses de edad y del 20 % en vacas Jersey adultas, alimentados en ambos casos con heno de alfalfa y concentrados. Estos resultados guardan relación con el informe de Hansard et al. (1968), que hallaron un valor de 22 ± 5 % en vaquillonas cruce preñadas y alimentadas con una dieta que contenía 28 ppm de Zn. Neathery et al. (1973a) citaron una absorción verdadera más elevada (34,8 %) en vacas Holstein en lactación, y que consumían dietas que proveían 39,5 ppm de Zn, de manera tal que el coeficiente de 0,15 para vacas lecheras adoptado por el NRC (2001) podría ser demasiado conservador. El NRC (2007) adopta coeficientes de absorción verdadera diferentes para cada categoría: 0,15 para ovejas adultas y 0,20 a 0,30 para corderos. Un sistema más ambicioso de cálculo del aporte de Zn absorbible o (digestible) en rumiantes podría seguir los lineamientos del método de la Proteína Metabolizable del NRC (2001) y del AFRC (1993), ambos basados en el trabajo de Orskov y McDonald (1979). Para ello, sería necesario contar con un cuerpo de investigación que permita comprender y cuantificar la degradación del Zn proveniente de los alimentos a nivel ruminal, su incorporación a la biomasa microbiana (bacterias, protozoos y hongos anaerobios) y la disponibilidad de este Zn (principalmente bacteriano) a nivel del intestino delgado y, además, la digestibilidad del Zn proveniente del alimento no degradado en el rumen. Sintéticamente, el modelo de Zn Digestible propuesto se presenta en la Figura IV.1. La cantidad de Zn digestible total en intestino delgado resulta, entonces, de la suma del Zn microbiano digestible, el Zn dietario no degradado en rumen digestible y el Zn endógeno digestible. Como se comenta en el Capítulo I, muy pocos trabajos han explorado caminos en este sentido. Emanuele y Staples (1990) señalan valores contrastantes entre la alfalfa (*Medicago sativa*) y gramíneas, como el *Cynodon dactylon*, para las dos fracciones de Zn en rumen: a: 25,8 y 43,1 %, b: 53,6 y 19 %, respectivamente. Aunque no se citan las tasas de degradación de la fracción b, esto parece indicar que existen diferencias sustanciales entre los diferentes alimentos, así como importantes interacciones entre concentrados y forrajes (Kabaija y Smith, 1988), y amerita una mayor atención hacia el tema. El Zn que se solubiliza en el rumen es tomado rápida y eficientemente por la población microbiana (Kennedy et al., 1993) y una mayor proporción de Zn dietario tomado por los microorganismos ruminales podría mejorar la disponibilidad del mineral a nivel intestinal, de acuerdo a las observaciones de Ivan et al. (1983). Sin embargo,

Figura IV.1. Modelo propuesto de Zn Digestible para rumiantes.



Referencias de la Figura IV.1:

- a: Fracción de Zn dietario rápidamente degradada en rumen.
 b: Fracción de Zn dietario potencialmente degradable en rumen.
 c: Fracción indigestible de Zn dietario.

ZnDR: Zn degradado a nivel ruminal.

ZnNDR: Zn no degradado a nivel ruminal.

ZnNDRD: Zn no degradado a nivel ruminal digestible.

EUM: Eficiencia de utilización microbiana.

ZnM: Zn microbiano.

ZnMD: Zn microbiano digestible.

ZnEnd: Zn endógeno.

ZnEndD: Zn endógeno digestible.

Dig: Digestibilidad.

ZnD: Zn digestible.

$$\text{ZnDR} = a + b \left[\frac{k_d}{k_d + k_p} \right]$$

$$\text{ZnNDR} = b \left[\frac{k_p}{k_d + k_p} \right] + c$$

Donde:

k_d : tasa de degradación de la fracción b (en %/h).

k_p : tasa de pasaje en rumen (en %/h).

la información disponible hasta el momento es muy escasa y fragmentaria. Finalmente, habría que incorporar al modelo la fracción de Zn degradado o solubilizado a nivel ruminal, que no es tomado por la población microbiana, y que llega como Zn soluble (probablemente ligado a proteínas) al intestino delgado. El sistema propuesto, entonces, conforma una nueva línea de investigación que puede permitir la comparación más ajustada de los requerimientos de Zn digestible con los aportes de distintas dietas en diferentes situaciones nutricionales.

En el sentido de nuestro trabajo de investigación, y a la luz del análisis de los resultados presentados en los Capítulos II y III, para la realización de futuros ensayos referidos a BDR del Zn, podrían incorporarse algunas modificaciones:

a) En primer lugar, podría mejorarse la composición de la dieta basal. Si bien los objetivos perseguidos al desarrollar un modelo de deficiencia subclínica de Zn fueron alcanzados, la dieta utilizada impuso fuertes limitaciones a la posibilidad de alcanzar un consumo de alimento *ad libitum* o cercano al mismo, de manera de obtener una ganancia de peso en los corderos similar a aquellos que consumen pasturas de alta calidad. Un mayor consumo de alimento podría incrementar la demanda de nutrientes, y en especial de Zn, de manera que sería más probable una respuesta a la suplementación en parámetros productivos relevantes, como ganancia de peso y producción de lana. En este sentido, probablemente, una alternativa superadora al uso de almidón de maíz comercial en polvo sea desarrollar un tipo de almidón protegido, de baja degradabilidad ruminal, pero de adecuada digestibilidad a nivel de intestino delgado. Otro enfoque es bajar el contenido de almidón de la dieta y utilizar una fuente de fibra dietaria de alta degradabilidad, tal como pulpa de remolacha. Se exploró la posibilidad de realizar un tratamiento de la paja de trigo con hidróxido de sodio, no sólo con el objetivo de mejorar su digestibilidad sino apuntando a un posible efecto sobre los niveles de Zn (resultados no publicados). Todas las muestras de paja de trigo obtenidas tuvieron niveles relativamente altos de Zn (entre 9 y 12 ppm, base MS), y no fue posible disminuir esos niveles con dicho tratamiento con hidróxido de sodio. De esta manera, si bien el uso de paja de trigo tratada con álcali hubiera permitido un uso menor de almidón, también hubiera incrementado innecesariamente los niveles de Zn de la dieta basal. Otra posibilidad para ser explorada incluye el tratamiento de las fuentes de fibra con sulfito, utilizado en el blanqueamiento del papel o de la fibra de algodón de uso doméstico. La fibra de algodón blanqueada fue propuesta por Mills et al. (1967) y Mills (1978) para su uso en una proporción del 9 % de la dieta de rumiantes.

b) En segundo lugar, la dieta Basal debería poseer una concentración cercana a los 5 ppm de Zn para producir un período de depleción más corto y, probablemente, una menor duración del experimento. El uso de dietas con niveles tan bajos de Zn debe, necesariamente, asegurar que no afectan *per se* el consumo de alimento, debido a la anorexia asociada a la deficiencia de Zn.

c) Por otro lado, pueden plantearse ensayos con 3 niveles de inclusión de Zn suplementario (5, 10 y 15 ppm) a adicionar a la dieta basal, lo cual, aunque incrementa la demanda de recursos materiales, probablemente mejore la sensibilidad de la prueba de comparación de pendientes.

d) También en este sentido, los estudios de BDR pueden mejorarse con un número mayor de animales por tratamiento (un mínimo de 6, de acuerdo a Panemangalore y Bebe, 1997), especialmente en lo referido a aquellos parámetros afectados por un mayor coeficiente de variación.

Otro aspecto que no ha sido suficientemente explorado en trabajos de investigación (por ejemplo, con cultivos de epitelio intestinal) es la posible absorción de Zn unido a pequeños

péptidos o bien formando un complejo Zn-aminoácido. Este es uno de los mecanismos esgrimidos por quienes sostienen una superior biodisponibilidad de algunas formas orgánicas de Zn (aminoatos y proteínatos), pero que no ha sido fehacientemente demostrado. Wright (2000) midió la captación y el transporte de Zn a partir de ZnSO_4 y proteínato de Zn mediante el uso de una línea celular de adenocarcinoma humano (Caco-2). En este ensayo no pudieron demostrarse diferencias entre las fuentes de Zn y tampoco se profundizó en las posibles diferencias en los mecanismos de absorción. La metionina es absorbida a nivel intestinal por un transportador de aminoácidos neutros, denominado B⁰AT1 (SLC6A19), que utiliza el cotransporte de Na^+ (Bröer, 2008), y no existe ninguna evidencia experimental que fundamente la posibilidad de que este aminoácido, ni ningún otro, pueda ser absorbido unido a una molécula de Zn^{++} . Por otro lado, Gilbert et al. (2008) han revisado los mecanismos de absorción de di y tripéptidos a nivel del tubo gastrointestinal. El mecanismo principal de captación de estos péptidos por los enterocitos involucra un transportador llamado PepT1, cuyo modo de acción implica un cotransporte de H^+ . En este caso, se cita la posibilidad de que algunos cationes (Zn^{++} , Mn^{++} y Cu^{++}) puedan interactuar con la proteína transportadora para incrementar la absorción de péptidos (Leibach y Ganapathy, 1996), pero esto no implica que los péptidos unidos a moléculas de Zn puedan absorberse usando el transportador.

La industria de la nutrición animal ha presentado en las últimas décadas diferentes alternativas de fuentes orgánicas de microminerales, esgrimiendo el argumento de que su mejor biodisponibilidad permite cubrir los requerimientos nutricionales con una menor cantidad de suplementación dietaria, y así disminuir sensiblemente la excreción de minerales por parte de los animales, lo cual posibilita aminorar el impacto sobre el medio ambiente, especialmente en el caso de los feedlots y las grandes granjas de aves y cerdos. Si bien el objetivo aparece como un aporte importante desde el punto de vista ambiental, ha sido evaluado en muy escasas oportunidades, y probablemente su impacto dista mucho de los aportes realizados a partir del uso de los aminoácidos sintéticos y la formulación en base a aminoácidos digestibles en monogástricos, o del uso de las fitasas exógenas para mejorar la digestibilidad del fósforo (P) a partir de fuentes vegetales, también en monogástricos. Estas son dos estrategias que realmente han contribuido a mejorar el impacto ambiental de las grandes estructuras productivas de cerdos y aves, al reducir la excreción de N y P. Las fitasas de origen microbiano son reconocidas como las enzimas exógenas de mayor importancia en nutrición animal (NRC, 2012). A manera de ejemplo, el uso de fitasas permite degradar a nivel de intestino delgado de los cerdos alrededor del 50 % del P fítico y reducir la excreción de P entre un 42% (Lei et al., 1993) y un 49 % (Almeida y Stein, 2010). Su efecto sobre el Zn es un poco menor, pero todavía muy significativo, ya que reduce alrededor de un 30 % la excreción fecal de Zn en cerdos y su uso adecuado permite suplantar unas 30 ppm de Zn a partir de ZnSO_4 (Jondreville et al., 2005). En rumiantes, en ausencia de un efecto antagónico de los fitatos sobre la absorción del Zn y, por lo tanto, al no tener sentido práctico el uso de fitasas, es aún más imperiosa la necesidad de hallar fuentes de Zn con una óptima disponibilidad, y generar nueva investigación sobre el tema.

Tomados conjuntamente, los resultados de ambos trabajos que componen esta tesis demuestran la factibilidad de la utilización de este tipo de metodología, probablemente con las modificaciones arriba apuntadas, en ensayos de BDR del Zn en rumiantes. Futuras líneas de investigación podrían utilizar modelos refinados de Zn digestible, a la vez que parámetros bioquímicos y productivos relevantes, en la comparación de la biodisponibilidad del Zn a partir de nuevos productos ofrecidos por la industria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackland, M.L.; Mercer, J.F. 1992. The murine mutation, lethal milk, results in production of zinc-deficient milk. *J. Nutr.* 122: 1214-1218.
- Adeniyi, F.A.; Heaton, F.W. 1980. The effect of zinc deficiency on alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) and its isoenzymes. *Br. J. Nutr.* 43: 561-569.
- Agget, P.J.; Favier, A. 1993. Zinc. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 63: 301-307.
- Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB International. Wallingford, UK.
- Allan, J.E. 1961. The determination of zinc in agricultural materials by atomic absorption spectrophotometry. *Analyst* 86: 530-534.
- Almeida, F.N.; Stein, H.H. 2010. Performance and phosphorus balance of pigs fed diets formulated on the basis of values for standardized total tract digestibility of phosphorus. *J. Anim. Sci.* 88: 2968-2977.
- Al-Saad, K.M.; Al-Sadi, H.I.; Abdulla, O.A. 2011. Zinc deficiency (hypo zincemia) in local Iraqi cattle. *Res. Opin. Anim.* 1: 418-424.
- Al-Saad, K.M.; Al-Sadi, H.I.; Abdul-Majeed, M.O. 2010. Clinical, hematological, biochemical and pathological studies on zinc deficiency (hypo zincemia) in sheep. *Vet. Res.* 3: 14-20.
- Ammerman, C.B. 1995. 4. Methods for estimation of mineral bioavailability. In: *Bioavailability of nutrients for animals*. C.B. Ammerman, D.H. Baker y A.J. Lewis, Eds. Academic Press. San Diego. USA. p. 83-94.
- Ammerman, C.B.; Baker, D.H.; Lewis, A.J. 1995. Introduction. In: *Bioavailability of nutrients for animals*. C.B. Ammerman, D.H. Baker y A.J. Lewis, Eds. Academic Press. San Diego. USA. p. 1-3.
- Andrews, G.K. 2008. Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 1242-1246.
- Anónimo. 2001a. Availa-Zn found to have rumen stability characteristics similar to that of Zinpro. Technical Bulletin TB-R-3001. Zinpro Corporation. Eden Prairie, MN, USA.
- Anónimo. 2001b. Second study confirms rumen stability of Availa-Zn zinc amino acid complex. Technical Bulletin TB-R-3006. Zinpro Corporation. Eden Prairie, MN, USA.
- Apgar, J. 1968. Effect of zinc deficiency on parturition in the rat. *Am. J. Physiol.* 215: 160-163.
- Apgar, J. 1971. Effect of low zinc diet during gestation on reproduction in the rabbit. *J. Anim. Sci.* 33: 1255-1258.
- Apgar, J.; Fitzgerald, J.A. 1985. Effect on the ewe and lamb of low intake throughout pregnancy. *J. Anim. Sci.* 60: 1530-1538.
- Arelovich, H.M.; Laborde, H.E.; Amela, M.I.; Torrea, M.B.; Martínez, M.F. 2008. Effects of dietary addition of zinc and (or) monensin on performance, rumen fermentation and digesta kinetics in beef cattle. *Span. J. Agric. Res.* 6: 362-372.
- Arelovich, H.M.; Owens, F.N.; Horn, G.W.; Vizcarra, J.A. 2000. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake, and digestion by cattle fed prairie hay and urea. *J. Anim. Sci.* 78: 2972-2979.
- Argiratos, V.; Samman, S. 1994. The effect of calcium carbonate and calcium citrate on the absorption of zinc in healthy female subjects. *Eur. J. Cl. Nutr.* 48: 198-204.
- Arora, S.P.; Hatfield, E.E; Garrigus, U.S.; Lohman, T.G.; Doane, B.B. 1969. Zinc-65 uptake by rumen tissue. *J. Nutr.* 97: 25-28.

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis. 15th Ed. AOAC. Arlington, Virginia (USA).
- Avery, R.A.; Bettger, W.J. 1992. Zinc deficiency alters the protein composition of the membrane skeleton but not the extractability of oligomeric form of spectrin in rat erythrocyte membrane. *J. Nutr.* 122: 428-434.
- Aydemir, T.B.; Blanchard, R.K.; Cousins, R.J. 2006. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 1699-1704.
- Bacha, W.J.; Bacha, L.M. 2001. Atlas color de histología veterinaria. Segunda edición. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina.
- Baer, M.T.; King, J.C. 1984. Tissue levels and zinc excretion during experimental zinc depletion in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 39: 556-570.
- Baker, D.H.; Ammerman, C.B. 1995. Zinc bioavailability. In: Bioavailability of nutrients for animals. C.B. Ammerman, D.H. Baker y A. J. Lewis, Eds. San Diego. USA. p. 367-398.
- Barash, I.A.; Cheung, C.C.; Weigle, D.S.; Ren, H.; Kramer, J.M.; Fallon, M.; Kabigting, E.B.; Kuijper, J.L.; Clifton, D.K.; Steiner, R.A. 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137: 3144-3147.
- Barney, G.H.; Macapinlac, M.P.; Pearson, W.N.; Darby, W.J. 1967. Parakeratosis of the tongue – a unique histopathologic lesion in the zinc-deficient squirrel monkey. *J. Nutr.* 93: 511-517.
- Barney G.H.; Orgebin-Crist, M.C.; Macapinlac, M.P. 1968. Genesis of esophageal parakeratosis and histologic changes in the testes of the zinc-deficient rat and their reversal by zinc repletion. *J. Nutr.* 95: 526-534.
- Bateman II, H.G.; Williams, C.C.; Gantt, D.T.; Chung, Y.H.; Beem, A.E.; Stanley, C.C.; Goodier, G.E.; Hoyt, P.G.; Ward, J.D.; Bunting, L.D. 2004. Effects of zinc and sodium monensin on ruminal degradation of lysine-HCl and liquid 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid. *J. Dairy Sci.* 87: 2571-2577.
- Beach, R.S.; Gershwin, M.E.; Hurley, L.S. 1980. Growth and development in postnatally zinc-deprived mice. *J. Nutr.* 110: 210-211.
- Beeson, W.M.; Perry, T.W.; Zurcher, T.D. 1977. Effect of supplemental zinc on growth and on hair and blood serum levels of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 45: 160-165.
- Begum, N.A.; Kobayashi, M.; Moriwaki, Y.; Matsumoto, M.; Toyoshima, K., Seya, T. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* 80:630-645.
- Begum, N.A.; Ishii, K.; Kurita-Taniguchi, M.; Tanabe, M.; Kobayashi, M.; Moriwaki, Y.; Matsumoto, M.; Fukumori, Y.; Azuma, I.; Toyoshima, K., Seya, T. 2004. *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infection and Immunity* 72: 937-948.
- Bentley, P.J.; Grubb, B.R. 1991. Effects of a zinc-deficient diet on tissue zinc concentrations in rabbits. *J. Anim. Sci.* 69: 4876-4882.
- Berzin, N.I.; Bauman, V.K. 1987. Vitamine A-dependent zinc-binding protein and intestinal absorption of zinc in chicks. *Br. J. Nutr.* 57: 255-268.
- Bettger, W.J.; Taylor, C.G. 1986. Effects of copper and zinc status of rats on the concentration of copper and zinc in the erythrocyte membrane. *Nutr. Res.* 6: 451-457.
- Birckner, V. 1919. The zinc content of some food products. *J. Biol. Chem.* 38: 191-203.

- Blackmon, D.M.; Miller, W.J.; Morton, J.D. 1967. Zinc deficiency in ruminants. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 62: 265-270.
- Blakeborough, P.; Salter, D.N. 1987. The intestinal transport of zinc studied using brush-border-membrane vesicles from the piglet. *Br. J. Nutr.* 57: 45-55.
- Blalock, T.L.; Dunn, M.A.; Cousins, R.J. 1988. Metallothionein gene expression in rats: tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J. Nutr.* 118: 222-228.
- Bly, M. 2006. Examination of the zinc transporter gene, SLC39A12. *Schizophr. Res.* 81: 321-322.
- Bobilya, D.J.; Johanning, G.L.; Veum, T.L.; O'Dell, B.L. 1994. Chronological loss of bone zinc during dietary zinc deprivation in neonatal pigs. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 649-653.
- Bonaventura, P., Benedetti, G.; Albarède, F.; Miossec, P. 2015. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoim. Rev.* 14: 277-285.
- Bostico, A.; Bonomi, A. 1964. Zinc content of forage. *Atti. Soc. Ital. Sci. Vet.* 18: 268. (*Nutr. Abs. Rev.* 35: 1224).
- Brandão-Neto, J.; Stefan, V.; Mendonca, B.B.; Bloise, W.; Castro, A.V.B. 1995. The essential role of zinc in growth. *Nutr. Res.* 15: 335-35.
- Bremner, I.; Young, B.W.; Mills, C.F. 1976. Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in sheep. *Br. J. Nutr.* 36: 551-561.
- Bronner, F. 1987. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J. Nutr.* 117: 1347-1352.
- Bröer, S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88: 249-286.
- Brown, T.F.; Zeringue, L.K. 1994. Laboratory evaluations of solubility and structural integrity of complexed and chelated trace mineral supplements. *J. Dairy Sci.* 77: 181-189.
- Browning, J.D.; MacDonald, R.S.; Thornton, W.; O'Dell, B.L. 1998. Reduced feed intake in zinc deficient rats is normalized by megestrol acetate but not by insulin-like growth factor-1. *J. Nutr.* 128: 136-142.
- Browning, J.D.; O'Dell, B.L. 1994. Low zinc status in guinea pigs impairs calcium uptake by brain synaptosomes. *J. Nutr.* 124: 436-443.
- Brugger, D.; Buffler, M.; Windisch, W. 2014. Development of an experimental model to assess the bioavailability of zinc in practical piglets diets. *Arch. Anim. Nutr.* 68: 73-924.
Daniel Brugger^a, Marzell Buffler^a & Wilhelm Windisch^{a*}
- Brummerstedt, E. 1977. Animal model of human disease. Acrodermatitis enteropathica, zinc malabsorption. *Am. J. Pathol.* 87: 725-728.
- Brummerstedt, E.; Flagstad, T.; Basse, A.; Anderson, E. 1971. The effect of zinc on calves with hereditary thymic hypoplasia (lethal trait A 46). *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 79: 686-687.
- Brzóska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol.* 39: 967-980.
- Bull, L.S.; Bush, L.J.; Friend, J.D.; Harris, B., Jr.; Jones, E.W. 1965. Incidence of ruminal parakeratosis in calves fed different rations and its relation to volatile fatty acid absorption. *J. Dairy Sci.* 48: 1459-1466.
- Bunce, G.E.; Vessal, M. 1987. Effect of zinc and/or pyridoxine deficiency upon oestrogen retention and oestrogen receptor distribution in the rat uterus. *J. Steroid. Biochem.* 26: 303-308.

- Burrell, A.L.; Dozier 3rd, W.A.; Davies, A.J.; Compton, M.M.; Freeman, M.E.; Vendrell, P.F.; Ward, T.L. 2004. Responses of broilers to dietary zinc concentrations and sources in relation to environmental implications. *Br. Poultry Sci.* 45: 255-263.
- Campbell, J.K.; Mills, C.F. 1979. The toxicity of zinc to pregnant sheep. *Environ. Res.* 201: 1-13.
- Cao, J.; Bobo, J.A.; Liuzzi, J.P.; Cousins, R.J. 2001. Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 170: 559-556.
- Cao, J.; Henry, P.R.; Guo, R.; Holwerda, R.A.; Toth, J.P.; Littell, R.C.; Miles, R.D.; Ammermann, C.B. 2000. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *J. Anim. Sci.* 78: 2039-2054.
- Carcagno, A.R.; Gullace, F.A.; Soler, I.J.; Fernández, C.A.; De Bernardi, A.M.; Capaul, E.G. 1993. Zn en plasma y pelo. Valores y distribución en 150 novillos Aberdeen Angus. *Rev. Med. Vet.* 74: 42-46.
- Carney, S.M.; Underwood, B.A.; Loerch, J.D. 1976. Effect of zinc and vitamin A deficient diets on the hepatic mobilisation and urinary excretion of vitamin A in rats. *J. Nutr.* 106: 1773-1781.
- Chausmer, A.B. 1998. Zinc, insulin and diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.* 17: 109-115.
- Chesters, J.K. 1978. Biochemical functions of zinc in animals. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* 32: 135-164.
- Chesters, J.K.; Petrie, L.; Travis, A.J. 1990. A requirement for Zn²⁺ for the induction of thymidine kinase but not ornithine decarboxylase in 3T3 cells stimulated from quiescence. *Biochem. J.* 272: 525-527.
- Chhabra, A.; Arora, S.P. 1985. Effect of Zn deficiency on serum vitamin A level, tissue enzymes and histological alterations in goats. *Livestock Prod. Sci.* 12: 69-77.
- Chimienti, F.; Devergnas, S.; Favier, A.; Seve, M. 2004. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53: 2330-2337.
- Chimienti, F.; Devergnas, S.; Pattou, F.; Schuit, F.; García-Cuenca, R.; Vanderwalle, B.; Kerr-Conte, J.; Van Lommel, L.; Grunwald, D., Favier, A.; Seve, M. 2006. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J. Cell. Sci.* 119: 4199-4206.
- Chirase, N.K.; Hutcheson, D.P.; Thompson, G.B.; Spears, J.W. 1994. Recovery rate and plasma zinc and copper concentrations of steer calves fed organic and inorganic zinc and manganese sources with or without injectable copper and challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Anim. Sci.* 72: 212-219.
- Chowanadisai, W.; Kelleher, S.L.; Lönnerdal, B. 2005. Zinc deficiency is associated with increasek brain zinc import and LIV-1 expression and decreased ZnT-1 expression in neonatal rats. *J. Nutr.* 135: 1002-1007.
- Colvard, D.S.; Wilson, E.M. 1984. Zinc potentiation of androgen receptor binding to nuclei in vitro. *Biochemistry* 23: 3471-3478.
- Combs, D.K. 1987. Hair analysis as an indicator of mineral status of livestock. *J. Anim. Sci.* 65: 1753-1758.
- Combs, D.K.; Goodrich, R.D.; Meiske, J.C. 1982. Mineral concentrations in hair as indicators of mineral status: a review. *J. Anim. Sci.* 54: 391-398.

- Condomina, J.; Zomoza-Sabina, T.; Granero, L.; Polache, A. 2002. Kinetics of zinc transport in vitro in rat small intestine and colon: interactions with copper. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16: 289-285.
- Coppen, D.E.; Davies, N.T. 1987. Studies on the effects of dietary zinc dose on ⁶⁵Zn absorption in vivo and on the effects of Zn status on the ⁶⁵Zn absorption and body loss in young rats. *Br. J. Nutr.* 57: 35-44.
- Corbellini, C.N. 1998. Influencia de los micronutrientes en la fertilidad en bovinos lecheros. *Rev. Med. Vet. (complemento)* 79: 8-13.
- Corbellini, C.N.; Mangoni, A.R.; Mattos, A.C.; Auzmendi, J. 1997. Efectos de la suplementación con óxido de zinc o metionina-zinc en vacas lecheras marginalmente deficientes. *Rev. Med. Vet.* 78: 439-447.
- Cousins, R.J. 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65: 238-309.
- Cousins, R.J. 1994. Metal elements and gene expression. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 449-469.
- Cousins, R.J. 1998. A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proc. Nutr. Soc.* 57: 307-311.
- Cousins, R.J. 2010. Gastrointestinal factors influencing zinc absorption and homeostasis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 80: 243-248.
- Cousins, R.J.; Blanchard, R.K.; Moore, J.B.; Cui, L.; Green, C.L.; Liuzzi, J.P.; Cao, J.; Bobo, J.A. 2003. Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes. *J. Nutr.* 133: 1521S-1526S.
- Cousins, R.J.; Blanchard, R.K.; Popp, M.P.; Liu, L.; Cao, J. 2003. A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6952-6957.
- Cousins, R.J.; Lee-Ambrose, L.M. 1992. Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats. *J. Nutr.* 122: 56-64.
- Cousins, R.J.; Liuzzi, J.P.; Lichten, L.A. 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.* 281: 24085-24089.
- Cousins, R.J.; McMahan, R.J. 2000. Integrative aspects of zinc transporters. *J. Nutr.* 130: 1384S-1387S.
- Cox, D.H.; Hale, O.M. 1962. Liver iron depletion without copper loss in swine fed excess zinc. *J. Nutr.* 77: 225-228.
- Cragg, R.A.; Christie, G.R.; Phillips, S.R.; Russi, R.M.; Küry, S.; Mathers, J.C.; Taylor, P.M.; Ford, D. 2002. A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane. *J. Biol. Chem.* 277: 22789-22797.
- Cragg, R.A., Phillips, S.R.; Piper, J.M.; Varma, J.S.; Campbell, F.C.; Mathers, J.C.; Ford, D. 2005. Homeostatic regulation of zinc transporters in the human small intestine by dietary zinc supplementation. *Gut* 54: 469-478.
- Cramer, P.; Armache, K.-J.; Baumli, S.; Benkert, S.; Brueckner, F.; Buchen, C.; Damsma, G.E.; Dengl, S.; Geiger, S.R.; Jasiak, A.J.; Jawhari, A.; Jennebach, S.; Kamenski, T.; Kettenberger, H.; Kuhn, C.-D.; Lehmann, E.; Leike, K.; Sydow, J.F.; Vannini, A. 2008. Structure of eukaryotic RNA Polymerases. *Annu. Rev. Biophys.* 37: 337-352.
- Cross, R.F.; Parker, C.F. 1981. Oral administration of zinc sulphate for control of ovine footrot. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178: 704-705.
- Cunningham, B.C.; Mulderrin, M.G.; Wells, J.A. 1991. Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science* 253: 545-548.

- Dabbs, T. P.; van Schie, H.; Glass, M. 1994. The effect of fibre curvature on Laserscan diameter measurement. IWTO Technology and Standards Committee Meeting. Nice, France. December 1994. Report 2.
- Dalton, T.; Fu, K.; Palmiter, R.D.; Andrews, G.K. 1996. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency. *J. Nutr.* 126: 825-833.
- Dardenne, M. 2002. Zinc and immune function. *Eur. J. Cl. Nutr.* 56 (suppl. 3): S20-S23.
- Davidson, L.; Almgren, S.; Sandstrom, B.; Hurrell, R.F. 1995. Zinc absorption in adult humans: the effect of iron fortification. *Br. J. Nutr.* 74: 417-425.
- Davis, S.R.; Cousins, R.J. 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.* 130: 1085-1088.
- Demertzis, P.N.; Mills, C.F. 1973. Oral zinc therapy in the control of infectious pododermatitis in young bulls. *Vet. Rec.* 93: 219-222.
- DePasquale-Jardieu, P.; Fraker, P.J. 1979. The role of corticosterone in the loss in immune function in the zinc-deficient A/J mouse. *J. Nutr.* 109: 1847-1855.
- Diamond, I.; Hurley, L.S. 1970. Histopathology of zinc-deficient fetal rats. *J. Nutr.* 100: 325-329.
- Diamond, I.; Swenerton, H.; Hurley, L.S. 1971. Testicular and esophageal lesions in zinc-deficient rats and their reversibility. *J. Nutr.* 101: 77-84.
- Doyle, J.J.; Pfander, W.H.; Grebing, S.E.; Pierce, J.O., 2nd. 1974. Effect of dietary cadmium on growth, cadmium absorption and cadmium tissue levels in growing lambs. *J. Nutr.* 104: 160-166.
- Dozier, W.A. 3rd; Davis, A.J.; Freeman, M.E.; Ward, T.L. 2003. Early growth and environmental implications of dietary zinc and copper concentrations and sources of broiler chicks. *Br. Poult. Sci.* 44: 726-731.
- Dreosti, I.E.; Hurley, L.S. 1975. Depressed thymidine kinase activity in zinc-deficient rat embryos. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 150: 161-165.
- Droke, E.A.; Gengelbach, G.P.; Spears, J.W. 1998. Influence of level and source (inorganic vs organic) of zinc supplementation on immune function in growing lambs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 11: 139-144.
- Droke, E.A.; Spears, J.W.; Armstrong, J.D.; Kegley, E.B.; Simpson, R.B. 1993. Dietary zinc affects serum concentration on insulin and insulin-like growth factor I in growing lambs. *J. Nutr.* 123:13-19.
- Dufner-Beattie, J.; Huang, Z.I.; Geiser, J., Xu, W.; Andrews, G.K. 2006. Mouse ZIP1 and ZIP3 genes together are essential for a adaptation to dietary zinc deficiency during pregnancy. *Genesis* 44: 239-251.
- Dufner-Beattie, J.; Juo, Y-M; Gitschier, J.; Andrews, G.K. 2004. The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters Zip4 and Zip5. *J. Biol. Chem.* 279: 49082-49090.
- Dufner-Beattie, J.; Langmade, S.J.; Wang, F.; Eide, D.; Andrews, G.K. 2003b. Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J. Biol. Chem.* 278: 50142-50150.
- Dufner-Beattie, J.; Wang, F.; Kuo, Y-M.; Gitschier, J.; Eide, D.; Andrews, G.K. 2003a. The acrodermatitis enteropathica gene Zip4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. *J. Biol. Chem.* 278: 3374-3378.
- Dufty, J.H.; Bingley, J.B.; Cove, L.Y. 1977. The plasma zinc concentration of nonpregnant, pregnant and parturient Hereford cattle. *Aus. Vet. J.* 53: 519-522.

- Duncan, J.; Hurley, L. 1978. Thymidine kinase and DNA polymerase activity in normal and zinc deficient rat embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol Med* 159: 39-43.
- Dursun, N.; Aydogan, S. 1995. The influence of dietary iron on zinc in rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 48: 161-171.
- Dynna, O.; Havre, G.N. 1963. Interrelationship of zinc and copper in the nutrition of cattle. *Acta Vet. Scand.* 4: 197-208.
- Eckhert, C.D.; Hurley, L.S. 1977. Reduced DNA synthesis in zinc deficiency: regional differences in embryonic rats. *J. Nutr.* 107: 855-861.
- Edwards, H.M., III; Baker, D.H. 1999. Bioavailability of zinc in several sources of zinc oxide, zinc sulfate, and zinc metal. *J. Anim. Sci.* 77: 2730-2735.
- Egan, A.R. 1972. Reproductive responses to supplemental zinc and manganese in grazing Dorset Horn ewes. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 12: 131-135.
- Eide, D.J. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 711-722.
- Eisenhaber, B.; Chumak, N.; Eisenhaber, F.; Hauser, M.-T. 2007. The ring between ring fingers (RBR) protein family. *Genome Biol.* 8: article 209.
- Ellis, C.D.; Macdiarmid, C.W.; Eide, D.J. 2005. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 280: 2811-2818.
- Emanuele, S.M.; Staples, C.R. 1990. Ruminant release of minerals from six forage species. *J. Anim. Sci.* 68: 2052-2060.
- Emery, M.P.; Browning, J.D.; O'Dell, B.L. 1990. Impaired hemostasis and platelet aggregation in rats fed diets based on egg white protein. *J. Nutr.* 120: 1062-1067.
- Emmert, J.L.; Baker, D.H. 1995. Zinc stores in chickens delay the onset of zinc deficiency symptoms. *Poultry Sci.* 74: 1011-1021.
- Engle, T.E.; Nockels, C.F.; Hossner, K.L.; Kimberling, C.V.; Toombs, R.E.; Yemm, R.S.; Weaber, D.L.; Johnson, A.B. 1997. Marginal zinc deficiency affects biochemical and physiological parameters in beef cattle heifer calves. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 10: 471-477.
- Erickson, J.C.; Hollopeter, G.; Palmiter, R.D. 1996. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science (Washington, D.C.)* 274: 1704-1707.
- Erway, L.C.; Grider, A., Jr. 1984. Zinc metabolism in lethal-milk mice. Otolith, lactation, and aging effects. *J. Hered.* 75: 480-484.
- Eryavuz, A.; Dehority, B.A. 2009. Effects of supplemental zinc concentrations on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151: 175-183.
- Essatara, M.B.; Levine, A.S.; Morley, J.E.; McClain, C.J. 1984. Zinc deficiency and anorexia in rats: the effect of central administration of norepinephrine, muscimol, and bromergocryptine. *Physiol. Behav.* 32: 479-482.
- Evans, G.W.; Johnson, E.E.; Johnson, P.E. 1979. Zinc absorption in the rat determined by radioisotope dilution. *J. Nutr.* 109: 1258-1264.
- Faber, C.; Gabriel, P.; Ibs, K.H.; Rink, L. 2004. Zinc in pharmacological doses suppresses allogeneic reaction without affecting the antigenic response. *Bone Marrow Transplant* 33: 1241-1246.
- Fairweather-Tait, S.J. 1987. The concept of bioavailability as it relates to iron nutrition. *Nutr. Res.* 7: 319-325.
- Fairweather-Tait, S. 1995. Iron-zinc and calcium-Fe interactions in relation to Zn and Fe absorptions. *Proc. Nutr. Soc.* 54: 465-473.

- Fairweather-Tait, S.; Hurrell, R.F. 1996. Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutr. Res., Rev.* 9: 295-324.
- Fairweather-Tait, S.J.; Jackson, M.J.; Fox, T.E.; Wharf, S.G.; Eagles, J.; Croghan, P.C. 1993. The measurement of exchangeable pools of zinc using the stable isotope ^{70}Zn . *Br. J. Nutr.* 70: 221-234.
- Falchuk, K.H. 1993. Zinc in developmental biology: the role of metal dependent transcription regulation. In: *Essential and toxic trace elements in human health and disease: an update*. A.S. Prasad, E. Willey-Liss. New York. p. 91-111.
- Favier, A.E. 1992. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. *Biol. Trace Elem. Res.* 32: 363-382.
- Fernandes, G.; Nair, M.; Onock, K.; Tonaka, T.; Floyd, R.; Good, R.A. 1979. Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 457-461.
- Fischer Walker, C.; Kordas, K.; Stoltzfus, R.J.; Black, R.E. 2005. Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 82: 5-12.
- Flanagan, P.R.; Haist, J.; Valberg, L.S. 1983. Zinc absorption, intraluminal Zn and intestinal metallothionein levels in zinc-deficient and zinc-repleted rodents. *J. Nutr.* 113: 962-972.
- Fleet, J.C.; Turnbull, A.J.; Bourcier, M.; Wood, R.J. 1993. Vitamin D-sensitive and quinacrine-sensitive zinc transport in human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* 264: G1037-G1045.
- Flynn, A.; Strain, W.H.; Pories, W.J. 1972. Corticotropin dependency on zinc ions *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46: 1113-1119.
- Fontenot, J.P.; Miller, R.F.; Price, N.O. 1964. Effect of calcium level and zinc supplementation of fattening lamb rations. *J. Anim. Sci.* 23: 874 (Abstract).
- Forbes, R.M. 1961. Excretory patterns and bone deposition of zinc, calcium and magnesium in the rat as influenced by zinc deficiency, EDTA and lactose. *J. Nutr.* 74: 194-200.
- Ford, D. 2004. Intestinal and placental zinc transport pathways. *Proc. Nutr. Soc.* 63: 21-29.
- Fordyce, E.J.; Forbes, R.M.; Robbins, K.R.; Erdman, J.W., Jr. 1987. Phytate x calcium/zinc molar ratios: Are they predictive of zinc bioavailability? *J. Food Sci.* 52: 440-445.
- Fosmire, G.J.; Greeley, S.; Sandstead, H.H. 1977. Maternal and fetal response to various suboptimal levels of zinc intake during gestation in the rat. *J. Nutr.* 107: 1543-1550.
- Fraker, P.J. 2005. Roles for cell death in zinc deficiency. *J. Nutr.* 135: 359-362.
- Fraker, P.J.; Gershwin, M.E.; Good, R.A.; Prasad, A.S. 1986. Interrelationships between zinc and immune function. *Fed. Proc.* 45: 1474-1479.
- Fraker, P.J.; King, L.E. 2001. A distinct role for apoptosis in the changes in lymphopoiesis and myelopoiesis created by deficiencies in zinc. *FASEB J.* 15: 2572-2578.
- Fraker, P.J.; King, L.E. 2004. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Ann. Rev. Nutr.* 24: 277-298.
- Fraker, P.J.; King, L.E.; Laako, T.; Vollmer, T. 2000. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J. Nutr.* 130: 1399S-1406S.
- Fraker, P.J.; Telford, W.G. 1997. A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215: 229-236.
- Franz, K.B.; Kennedy, B.M.; Fellers, D.A. 1980. Relative bioavailability of zinc using weight gain of rats. *J. Nutr.* 110: 2263-2271.

- Fredlund, K.; Isaksson, M.; Rossander-Hulthen, L.; Almgren, A.; Sandberg, A.S. 2006. Absorption of zinc and retention of calcium: dose-dependent inhibition by phytate. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20: 49-57.
- Froetschel, M.A.; Martin, A.C.; Amos, H.E.; Evans, J.J. 1990. Effects of zinc sulfate concentration and feeding frequency on ruminal protozoal numbers, fermentation patterns and amino acid passage in steers. *J. Anim. Sci.* 68: 2874-2884.
- Fukada, T.; Civic, N.; Furuichi, T.; Shimoda, S.; Mishima, K. 2008. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development: its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS ONE* 3: e3642 (13 p.).
- Fukamachi, Y.; Karasaki, Y.; Sugiura, T.; Itoh, H.; Abe, T.; Yamamura, K.; Igashi, K. 1998. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 364-369.
- Gaither, L.A.; Eide, D.J. 2000. Functional expression of the human hZip2 transporter. *J. Biol. Chem.* 275: 5560-5564.
- Gaither, L.A.; Eide, D.J. 2001a. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* 14: 14: 251-270.
- Gaither, L.A.; Eide, D.J. 2001b. The human Zip1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erytroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* 276: 22258-22264.
- Galdes, A.; Vallee, B.L. 1983. Categories of zinc metalloenzymes. In: *Zinc and its role in biology and nutrition (Metal ions in biological systems, vol. 15)*. H. Sigel and A. Sigel, Eds. Marcel Deker. New York. p 1-54.
- Garg, A.K.; Mudgal, V.; Dass, R.S. 2008. Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization and mineral profile in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144: 82-96.
- Geiser, J.; De Lisle, R.D., Andrews, G.K. 2013. The zinc transporter Zip5 (Slc39a5) regulates intestinal zinc excretion and protects the pancreas against zinc toxicity. *PloS ONE* 8: 1-11 (e82149).
- Gilbert, E.R.; Wong, E.A.; Webb, K.E., Jr. 2008. Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *J. Anim. Sci.* 86: 2135-2155.
- Giroux, E.; Prakash, N.J. 1977. Influence of zinc-ligand mixtures on serum zinc levels in rats. *J. Pharm. Sci.* 66: 391-395.
- Giroux, E.L.; Durieux, M.; Schechter, P.J. 1976. A study of zinc distribution in human serum. *Bioinorg. Chem.* 5: 211-218.
- Gisbert-González, S.L.; Torres-Molina, F. 1996. Zinc uptake in five sectors of the rat gastrointestinal tract: kinetic study in the whole colon. *Pharm. Res.* 13: 1154-1161.
- Giuliano, R.; Millward, D.J. 1984. Growth and zinc homeostasis in the severely Zn-deficient rat. *Br. J. Nutr.* 52: 545-560.
- Giunta, C.; Elçioglu, N.H.; Albrecht, B.; Eich, G.; Chambaz, C.; Janecke, A.R.; Yeowell, H.; Weiss, M.A.; Eyre, D.R., Kraenzlin, M.; Steinmann, B. 2008. Spondylocheiro dysplastic form of the Ehlers-Danlos syndrome - an autosomal-recessive entity caused by mutations in the zinc transporter gene SLC39A13. *Am. J. Hum. Genet.* 82: 1290-1305.
- González, G.P.; Buschiazzi, D.E. 1997. Contenidos de hierro, cobre, manganeso y cinc en suelos de la provincia de La Pampa, Argentina. *Actas del Taller de intercambio técnico "Estado de situación de la nutrición mineral en sistemas intensivos de producción de carne y leche"*. Buenos Aires, 28 de noviembre de 1997.

- Gordon, P.R.; O'Dell, B.L. 1980. Platelet aggregation impaired by short-term zinc deficiency. *J. Nutr.* 110: 2125-2129.
- Graham, T.W.; Holmberg, C.A.; Keen, C.L.; Thurmond, M.C.; Clegg, M.S. 1988. A pathological and toxicological evaluation of veal calves fed large amounts of zinc. *Vet. Pathol.* 25: 484-491.
- Graham, T.W.; Thurmond, M.C.; Gershwin, M.E.; Picanso, J.P.; Garvey, J.S.; Keen, C.L. 1994. Serum zinc and copper concentrations in relation to spontaneous abortion in cows: implications for human fetal loss. *J. Repr. Fert.* 102: 253-262.
- Greenough, P.R.; Weaver, A.D. 1997. Lameness in cattle. 3rd. Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA.
- Gunter, S.A.; Malcolm-Callis, K.J.; Duff, G.C.; Kegley, E.B. 2001. Performance of steers supplemented with zinc during grazing and receiving at the feedlot. *Prof. Anim. Sci.* 17: 280-286.
- Gupta, R.P.; Verma, P.C.; Garg, S.L. 1997. Effect of experimental zinc deficiency on thyroid gland in guinea-pigs. *Annals Nutr. and Metab.* 41: 376-381.
- Haaranen, S. 1963. Zinc requirements of dairy cattle for removal of deficiency symptoms. *Feedstuffs* 35: 17-18.
- Haase, H.; Rink, L. 2009. Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annu. Rev. Nutr.* 29: 133-152.
- Haase, H.; Rink, L. 2013. Zinc signals and immune function. *Biofactors* 40: 27-40.
- Hahn, J.D.; Baker, D.H. 1993. Growth and plasma zinc response of young pigs fed pharmacological levels of zinc. *J. Anim. Sci.* 71: 3020-3024.
- Hall, A.C.; Young, B.W.; Bremner, I. 1979. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. *J. Inorg. Biochem.* 11: 57-66.
- Hambidge, K.M. 2003. Biomarkers of trace mineral intake and status. *J. Nutr.* 133: 948S-955S.
- Hambidge, K.M.; Casey, C.E.; Krebs, N.F. 1986. Zinc. In: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Vol. 2. W. Mertz, Ed. Academic Press, New York. p. 1-37.
- Hambidge, K.M.; Krebs, N.F.; Westcott, J.E.; Miller, L.V. 2006. Changes in zinc absorption during development. *J. Pediatric.* 149: S64-S68.
- Hamdi, S.A.; Nassif, O.I., Ardawi, M.S. 1997. Effect of marginal or severe dietary zinc deficiency on testicular development and functions of the rat. *Arch. Androl.* 38: 243-253.
- Hansard, S.L.; Mohammed, A.S.; Turner, J.W. 1968. Gestation age effects upon maternal-fetal utilization in the bovine. *J. Anim. Sci.* 27: 1097-1102.
- Hatfield, P.G.; Swenson, C.K.; Kott, R.W.; Ansotegui, R.P.; Roth, N.J. ; Robinson, B.L. 2001. Zinc and copper status in ewes supplemented with sulfate- and amino acid-complexed forms of zinc and copper. *J. Anim. Sci.* 79: 261-266.
- He, L.; Girijashanker, K.; Dalton, T.P.; Reed, J.; Li, H.; Soleimani, M.; Nebert, D.W. 2006. ZIP8, member of the solute-carrier39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Mol. Pharmacol.* 70: 171-180.
- Heinrichs, A.J.; Conrad, H.R. 1983. Rumen solubility and breakdown of metal proteinate compounds. *J. Dairy Sci.* 66 (Suppl. 1): 147 (Abstract).
- Hempe, J.M.; Cousins, R.J. 1989. Effect of EDTA and zinc-methionine complex on zinc absorption by rat intestine. *J. Nutr.* 119: 1179-1187.

- Hempe, J.M.; Cousins, R.J. 1992. Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationships as a conceptual model for zinc absorption in rats. *J. Nutr.* 122: 89-95.
- Hesketh, J.E. 1982. Effects of zinc deficiency on Leydig cell ultrastructure in the boar. *J. Comp. Path.* 99: 239-247.
- Heth, D.A.; Hoekstra, W.G. 1965. Zinc-65 absorption and turnover in rats. I. A procedure to determine Zinc-65 absorption and the antagonistic effect of calcium in a practical diet. *J. Nutr.* 85: 367-374.
- Hidioglou, M. 1979. Trace element deficiencies and fertility in ruminants: a review. *J. Dairy Sci.* 62: 1195-1206.
- Hill, G.M.; Link, J.E. 2009. Transporters in the absorption and utilization of zinc and copper. *J. Anim. Sci.* 87 (E. Suppl): E85-E89.
- Hill, G.M.; Miller, E.R.; Stowe, H.D. 1983. Effect of dietary zinc levels on health and productivity of gilts and sows through two parities. *J. Anim. Sci.* 57: 114-122.
- Hill, D.A.; Peo, E.R.; Lewis, A.J. 1987. Effect of zinc source and picolinic acid on ⁶⁵Zn uptake in an in vitro continuous-flow perfusion system for pig and poultry intestinal segments. *J. Nutr.* 117: 1704-1707.
- Hill, D.A.; Peo, E.R.; Lewis, A.J.; Crenshaw, J.D. 1986. Zinc-aminoacid complexes for swine. *J. Anim. Sci.* 63: 121-130.
- Hoadley, J.E.; Leinart, A.S.; Cousins, R.J. 1987. Kinetic analysis of zinc uptake and serosal transfer by vascularly perfused rat intestine. *Am. J. Physiol.* 252: G825-G831.
- Hoekstra, W.G.; Faltin, E.C.; Lin, C.W.; Roberts, H.F., Grummer, R.H. 1967. Zinc deficiency in reproducing gilts fed a diet high in calcium and its effects on tissue zinc and blood serum alkaline phosphatase. *J. Anim. Sci.* 26: 1348-1357.
- Hönscheid, A.; Rink, L.; Haase, H. 2009. T-lymphocytes: a target for stimulatory and inhibitory effects of zinc ions. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 9:132-144.
- Huang, L.; Kischke, C.P.; Gitschier, J. 2002. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J. Biol. Chem.* 277: 26389-26395.
- Huang, L.; Kirschke, C.P.; Zhang, Y.; Yu, Y.Y. 2005. The Zip7 gene (Slc39a7) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 280: 15456-15463.
- Huang, L.; Yu, Y.Y.; Kirschke, C.P., Gertz, E.R.; Lloyd, K.K. 2007. Znt7- (Slc30a7)-deficient mice display reduced body zinc status and body fat accumulation. *J. Biol. Chem.* 282: 37053-37063.
- Huang, Y.L.; Lu, L.; Li, S.F.; Luo, X.G.; Liu, B. 2009. Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strengths for broilers fed a conventional corn-soybean meals diet. *J. Anim. Sci.* 87: 2038-2046.
- Hunt, C.D.; Johnson, P.E. 1990. The effects of dietary zinc on human sperm morphology and seminal mineral loss. In: Trace Element Metabolism in Man and Animals-7. Hurley, L.S., Lonnerdal, B. y Rucher, R.B., eds. Plenum, New York, USA.
- Hurley, L.S.; Swenerton, H. 1966. Congenital malformations resulting from zinc deficiency in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 123: 692-696.
- Hurley, L.S.; Swenerton, H. 1971. Lack of mobilization of bone and liver zinc under teratogenic conditions of zinc deficiency in rats. *J. Nutr.* 101: 597-60
- Ibs, K-H.; Rink, L. 2003. Zinc-altered immune function. *J. Nutr.* 133: 1452S-1456S.

- International Wool Textile Organization (IWTO). 2001. Test Method Number IWTO-12-00: Measurement of the mean and distribution of fibre diameter using the Sirolan Laserscan fibre diameter analyzer. Woolmark Co., Ilkley, U.K.
- Ikeda, A.; Sekine, H.; Takao, K.; Ikeda, M. 2013. Expression and localization of taste receptor genes in the vallate papillae of rats: effect on zinc deficiency. *Acta Oto-Laryngol.* 133: 957-964.
- International Wool Textile Organization (IWTO). 2002. Test Method Number IWTO-30-98: Determination of staple length and staple strength, Woolmark Co., Ilkley, U.K.
- Ivan, M.; Ihnat, M.; Veira, D.M. 1983. Flow and soluble proportions of zinc, manganese, copper and iron in the gastrointestinal tract of sheep fed corn or alfalfa silages. *Can. J. Anim. Sci.* 63: 163-171.
- Ivan, M.; Veira, D.M. 1981. The effect of dietary protein on the solubilities of manganese, copper, zinc and iron in the rumen and abomasum of sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 61: 955-959.
- Ivan, M.; Veira, D.M. 1982. Duodenal flow and soluble proportions of zinc, manganese, copper and iron in the rumen fluid and duodenal digesta of faunated and defaunated sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 62: 979-982.
- Jackson, K.A.; Valentine, R.A.; Conevworth, L.J.; Mathers, J.C.; Ford, D. 2008. Mechanisms of mammalian zinc-regulated gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 1262-1266.
- Jackson, M.J. 1989. Physiology of zinc: general aspects. In: *Zin in human biology*. C.F. Mills, Ed. Springer-Verlag. London. p. 1-14.
- Jackson, M.J.; Jones, D.A.; Edwards, R.H.T. 1982. Tissue zinc levels as an index of body zinc status. *Clin. Physiol.* 2: 333-343.
- Jackson, M.J.; Jones, D.A.; Edwards, R.H.T. 1984. Zinc homeostasis in man: studies using a new stable isotope-dilution technique. *Br. J. Nutr.* 51: 199-208.
- Jansen, J.; Karges, W., Rink, L. 2009. Zinc and diabetes – Clinical links and molecular mechanisms. *J. Nutr. Biochem.* 20: 399-417.
- Jenkins, K.J.; Hidiroglou, M. 1991. Tolerance of the preruminant calf for excess manganese or zinc in milk replacer. *J. Dairy Sci.* 74: 1047-1053.
- Jeong, J., Eide, D.J. 2013. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol. Aspects Med.* 34: 612-619.
- Jing, M.Y.; Sun, J.Y.; Weng, X.Y.; Wang, J.F. 2009. Effects of zinc levels on activities of gastrointestinal enzymes in growing rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93: 606-612.
- Johannig, G.L.; Browing, J.D.; Bobilya, D.J.; Veum, T.L.; O'Dell, B.L. 1990a. Effect of zinc deficiency and food restriction in the pig on erythrocyte fragility and plasma membrane composition. *Nutr. Res.* 10: 1463-1471.
- Johannig, G.L.; Browing, J.D.; Bobilya, D.J.; Veum, T.L.; O'Dell, B.L. 1990b. Effect of zinc deficiency on enzyme activities in rat and pig erythrocytes membranes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195: 224-229.
- Johannig, G.L.; O'Dell, B.L. 1989. Effect of zinc deficiency and food restriction in rats on erythrocyte membrane zinc, phospholipid and protein content. *J. Nutr.* 119: 1654-1660.
- John, E.; Laskow, T.C.; Buchser, W.J.; Pitt, B.R.; Basse, P.H.; Butterfield, L.H. Kalinski, P.; Lotze, M.T. 2010. Zinc in innate and adaptive tumor immunity. *J. Transl. Med.* 8: 118-133.
- Johnson, P.E.; Hunt, C.D.; Milne, D.B.; Mullen, L.K. 1993. Homeostatic control of zinc metabolism in men: zinc excretion and balance in men fed diets low in zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 557-565.

- Jondreville, C.; Hayler, R.; Feuerstein, D. 2005. Replacement of zinc sulphate by microbial phytase for piglets given a maize-soya-bean meal diet. *Anim. Sci.* 81: 77-83.
- Joseph, C.E.; Ahrafi, S.H.; Waterhouse, J.P. 1981. Structural changes in rabbit oral epithelium caused by zinc deficiency. *J. Nutr.* 111: 53-57.
- Jou, M-Y.; Hall, A.G.; Phillips, A.F.; Kelleher, S.L.; Lönnerdal, B. 2009. Tissue-specific alterations in zinc transporter expression in intestine and liver reflect a threshold for homeostatic compensation during dietary zinc deficiency in weanling rats. *J. Nutr.* 139: 835-841.
- Kabaija, E.; Smith, O.B. 1988a. The effect of age of regrowth on content and release of manganese, iron, zinc and copper from four tropical forages incubated in sacco in rumen of sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 20: 171-176.
- Kabaija, E., Smith, O.B. 1988b. Trace elements kinetics in the digestive tract of sheep fed diets with graded levels of dietary fibre. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 59: 218-224.
- Kadmas, J.L.; Beckerle, M.C. 2004. The LIM domains: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 920-931.
- Kambe, T.; Narita, H.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Hirose, J.; Amano, T.; Sigiura, N.; Sasaki, R.; Mori, K.; Iwanaga, T.; Nagao, M. 2002. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, Zinc Transporter 5, abundantly expressed in pancreatic β cells. *J. Biol. Chem.* 277: 19049-19055.
- Kane, E.; Morris, J.G.; Rogers, Q.R.; Ihrke, P.J.; Cupps, P.T. 1981. Zinc deficiency in the cat. *J. Nutr.* 111: 488-495.
- Kasana, S.; Din, J.; Maret, W. 2015. Genetic causes and gene-nutrients interactions in mammalian zinc deficiencies: Acrodermatitis enteropathica and transient neonatal zinc deficiency as examples. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29: 47-62.
- Keen, C.L.; Taubeneek, M.W.; Daston, G.P.; Rogers, J.M.; Gershwin, M.E. 1993. Primary and secondary zinc deficiency as factors underlying abnormal CNS development. *Annals NY Acad. Sci.* 678: 37-47.
- Kegley, E.B.; Spears, J.W. 1994. Effect of zinc supplementation on performance and zinc metabolism of lambs fed forage-based diets. *J. Agr. Sci. (Cambridge)* 123: 287-292.
- Kegley, E.B.; Silzell, S.; Kreider, D.L.; Galloway, D.L.; Coffey, K.P.; Hornsby, J.A.; Hubbell, D.S., III. 2001. The immune response and performance of calves supplemented with zinc from an organic and an inorganic source. *Prof. Anim. Sci.* 17: 33-38.
- Kegley, E.B.; Spears, J.W. 1994. Effect of zinc supplementation on performance and zinc metabolism of lambs fed forage-based diets. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 123: 287-292.
- Kegley, E.B.; Spears, J.W. 1995. Immune response and performance of sheep fed supplemental zinc as zinc oxide or methionine zinc. *Sheep & Goat Res. J.* 11: 127-131.
- Kelleger, S.L.; Lönnerdal, B. 2002. Zinc transporters in the rat mammary gland respond to marginal zinc and vitamin A intakes during lactation. *J. Nutr.* 132: 3280-3285.
- Kelleher, S.I.; Lönnerdal, B. 2005. Zip3 plays a major role in zinc uptake into mammary epithelial cells and is regulated by prolactin. *Am. J. Physiol.* 288: C1042-C1047.
- Kellogg, D.W. 1990. Zinc-methionine affects performance of lactating cows. *Feedstuffs* 62: 15.
- Kelsay, J.L.; Jacob, R.A.; Prathers, E.S. 1979. Effect of fiber from fruits and vegetables on metabolic responses of human subject. III. Zinc, copper and phosphorous balances. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 2307-2311.
- Kennedy, D.W.; Craig, W.M.; Southern, L.L. 1993. Ruminal distribution of zinc in steers fed a polysaccharide-zinc complex or zinc oxide. *J. Anim. Sci.* 71: 1281-1287.

- Kennedy, K.J.; Rains, T.M.; Shay, N.F. 1998. Zinc deficiency changes preferred macronutrient intake in subpopulation of Sprague-Dawley outbre rats and reduces hepatic pyruvate kinase gene expression. *J. Nutr.* 128: 43-49.
- Kidd, M.T.; Ferket, P.R.; Quresh, M.A. 1996. Zinc metabolism with special reference to its role in immunity. *World's Poultry Sci. J.* 52: 309-324.
- Kim, B.-E.; Wang, F.; Dufner-Beattie, J.; Andrews, G.K.; Eide, D.E.; Petris, M.J. 2004. Zn²⁺-stimulated endocytosis of the mZip4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279: 4523-4530.
- Kim, E.-S.; Noh, S.K.; Koo, S.I. 1998. Marginal zinc deficiency lowers the lymphatic absorption of α -tocopherol in rats. *J. Nutr.* 128: 265-270.
- Kincaid, R.L. 1979. Biological availability of zinc from inorganic sources with excess dietary calcium. *J. Dairy Sci.* 62: 1081-1085.
- Kincaid, R.L.; Chew, B.P.; Cronrath, J.D. 1997. Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: Effects on uptake and immunity. *J. Dairy Sci.* 80: 1381-1388.
- Kincaid, R.L.; Hodgson, A.S.; Riley, R.E., Jr.; Cronrath, J.D. 1984. Supplementation of diets for lactating cows with zinc as zinc oxide and zinc methionine. *J. Dairy Sci.* 67 (suppl. 1): 103.
- King, J.C. 1990. Assessment of zinc status. *J. Nutr.* 120: 1474-1479.
- King, J.C. 2000. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1334S-1343S.
- King, J.C. 2011. Zinc: an essential but elusive nutrient. *Am. J. Clin. Nutr.* 94: 679S-684S.
- King, J.C.; Shames, D.M.; Woodhouse, L.R. 2000. Zinc homeostasis in humans. *J. Nutr.* 130: 1360S-1366S.
- King, L.E.; Osati-Ashtiani, F.; Fraker, P. 1995. Depletion of cells of the B-linkage in the bone marrow on zinc deficient mouse. *Inmunology* 85: 69-73.
- King, L.E.; Osati-Ashtiani, F.; Fraker, P. 2002. Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice. *J. Nutr.* 132: 974-979.
- Kirchgessner, M. 1993. Underwood memorial lecture: Homeostasis and homeorhesis in trace element metabolism. In: *Trace Elements in Man and Animals- TEMA 8*. Anke, M., Meissner, D. y Mills, C.F., eds. Verlag Media Touristik, Dresden, Germany. P. 4.21.
- Kirchgessner, M.; Paulicks, B.R.; Roth, H.-P. 1993. Zinc in animal nutrition. Function, deficiency, diagnosis, requirements, supply and absorption. *Ciencia e Inv. Agraria* 20: 182-201.
- Kirchgessner, M.; Roth, H.-P. 1985. Influence of zinc depletion and zinc status on serum growth hormone levels in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 7: 263-268.
- Kirschke, C.P.; Huang, L. 2003. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi Apparatus. *J. Biol. Chem.* 278: 4096-4102.
- Kirchgessner, M.; Schwarz, W.A.; Roth, H.-P. 1978. Homeostasis of Zn-metabolism in experimentally induced Zn deficiency of dairy cows. *Trace Element Metabolism in Man and Animals - 3*. M. Kirchgessner, Ed. Freising-Weihenstephen, West Germany. p. 116-121.
- Klug, A. 2010. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu. Rev. Biochem.* 79: 213-231.
- Koo, S.L.; Turk, D.E. 1977. Effect of zinc deficiency on the ultrastructure of the pancreatic acinar cell and intestinal epithelium in the rat. *J. Nutr.* 1007: 896-908.
- Kordas, K.; Stoltzfus, R.J. 2004. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J. Nutr.* 134: 1295-1298.

- Krebs, N.R. 2000. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 130: 1374S-1377S.
- Kreuzer, M.; Kirchgessner, M. 1994. Effect of oral and i.v. iron on tissue retention and excretion of copper and zinc in growing rats. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 72: 242-251.
- Kroneman, J.; Mey, G.J.K.v.d.; Helder, A. 1975. Hereditary zinc deficiency in Dutch Friesian cattle. *Zentralblatt Vet. Med. A* 22: 201-208.
- Kumari, D.; Nair, N.; Bedwal, R.S. 2011. Effect of dietary zinc deficiency on testes of Wistar rats: morphometric and cell quantification studies. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25: 47-53.
- Kuo, I.C.; Seitz, B.; LaBree, L.; McDonnell, P.J. 1997. Can zinc prevent apoptosis of anterior keratocytes after superficial keratectomy? *Cornea* 16: 550-555.
- Kurtou, S.; Patiroglu, T.E., Karakas, S.E. 1987. Effecto of growth hormone on epiphyseal growth plates in zinc deficiency. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 12: 325-329.
- L'Abbe, M.R.; Fischer, P.W. 1984. The effects of high dietary zinc and copper deficiency on the activity of copper-requiring metalloenzymes in the growing rat. *J. Nutr.* 114: 813-822.
- Langmade, S.J.; Ravindra, R.; Daniels, P.J.; Andrews, G.K. 2000. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J. Biol. Chem.* 175: 34803-34809.
- Lauf, P.K.; Mangor-Jensen, A. 1984. Effects of A23187 and Ca²⁺ on volume and thiol-stimulated, ouabain-resistan K⁺ Cl⁻ fluxes in low K⁺ sheep erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 790-796.
- Leake, A.; Chisholm, G.D.; Habib, F.K. 1984. The effect of zinc on the 5 alpha-reduction of testosterone by the hyperplastic human prostate gland. *J. Steroid Biochem.* 20: 651-655.
- Lee, D.-Y.; Prasad, A.S.; Hydrick-Adair, C.; Brewer, G.; Johnson, P.E. 1993. Homeostasis of zinc in marginal human zinc deficiency: rol of absorption and endogenous excretion of zinc. *J. Lab. Clin. Med.* 122: 549-556.
- Lee, H.H.; Prasad, A.S.; Brewer, G.J.; Owyang, C. 1989. Zinc absorption in human small intestine. *Am. J. Physiol.* 256: G87-G91.
- Lee, J.; Treloar, B.P.; Grace, N.D. 1994. Metallothionein and trace element metabolism in sheep tissues in response to high and sustained zinc dosages. II. Expresion of metallothionein m-RNA. *Aus. J. Agric. Res.* 45: 321-332.
- Lee, R.J.; Rains, T.M.; Trovar-Palacio,C.; Beverly, J.L.; Shay, N.F. 1998. Zinc deficiency increases hypothalamic neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA levels and doesnt not block neuropeptide Y-induced feeding in rats. *J. Nutr.* 128: 1218-1223.
- Legg, S.P.; Sears, L. 1960. Zinc sulphate treatment of parakeratosis in cattle. *Nature* 4730: 1061-1062.
- Lei, X.G.; Ku, P.K.; Miller, E.R.; Yokoyama, M.T. 1993. Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase linearly improves phytate phosphorus utilization by weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 71: 3359-3367.
- Lemaire, K.; Chimienti, F.; Schuit, F. 2012. Zinc transporters and their role in the pancreatic β -cells. *J. Diabetes Invest.* 3: 202-211.
- Leibach, F.H.; Ganapathy, V. 1996. Peptide transporters in the intestine and kidney. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 99-119.
- Leibowitz, S.F.; Brown, L.L. 1980. Histochemical and pharmacological analysis of noradrenergic projections to the paraventricular hypothalamus in relation to feeding stimulation. *Brain Research* 201: 289-314.

- Levenson, C.W.; Shay, N.F.; Hempe, J.M.; Cousins, R.J. 1994. Expression of cysteine-rich intestinal protein in rat intestine and transfected cells is not zinc dependent. *J. Nutr.* 124: 13-17.
- Lewis, P.K. Jr.; Hoekstra, W.G.; Grummer, R.H. 1957. Restricted calcium feeding versus zinc supplementation for the control of parakeratosis in swine. *J. Anim. Sci.* 16: 578-588.
- Lichten, L.A.; Cousins, R.J. 2009. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiological regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 29: 153-176.
- Lin, W.; Chai, J.; Love, J.; Fu, D. 2010. Selective electrodiffusion of zinc ions in a Zrt-, Irt-like protein, ZIPB. *J. Biol. Chem.* 285: 39013-39020.
- Littell, R.C.; Freund, R.J.; Spector, P.C. 1991. SAS System for linear models. 3rd Edition. SAS Institute Incorporated. Cary, NC, USA.
- Littell, R.C.; Henry, P.R.; Ammermann, C.B. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Science* 76: 1216-1231.
- Littell, R.C.; Henry, P.R.; Lewis, A.J.; Ammerman, C.B. 1997. Estimation of relative bioavailability of nutrients using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 75: 2672-2683.
- Littell, R.C.; Lewis, A.J.; Henry, P.R. 1995. 1. Statistical evaluation of bioavailability assays. In: *Bioavailability of nutrients for animals*. C.B. Ammerman, D.H. Baker y A.J. Lewis, Eds. Academic Press. San Diego. USA. p. 5-33.
- Liuzzi, J.P.; Aydemir, F.; Nam, H.; Knutson, M.D.; Cousins, R.J. 2006. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 13612-13617.
- Liuzzi, J.P.; Blanchard, R.K.; Cousins, R.J. 2001. Differential regulation of zinc transporter 1,2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J. Nutr.* 131: 46-52.
- Liuzzi, J.P.; Bobo, J.A.; Cui, L.; McMahan, R.J., Cousins, R.J. 2003. Zinc transporters 1,2 and 4 are differentially expressed and localized in rats during pregnancy and lactation. *J. Nutr.* 133: 342-351.
- Liuzzi, J.P.; Cousins, R.J. 2004. Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 151-172.
- Liuzzi, J.P.; Lichten, L.A.; Rivera, S.; Blanchard, R.K.; Aydemir, T.B.; Knutson, M.D.; Ganz, T.; Cousins, R.J. 2005. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6843-6848.
- Llalès, J.P. 1995. Nutrition and immunology in ruminants, pigs and poultry. *Proceedings of the 9th International Conference on Production Diseases in Farm Animals*. Berlin. p. 63-74.
- Lohmar, P.H.; Toft, D.O. 1975. Inhibition of the binding of progesterone receptor to nuclei: effects of o-phenantroline and rifamycin AF/013. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 67: 8-15.
- Lönnerdal, B. 2007. Trace element transport in the mammary gland. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 165-177.
- Lönnerdal, B.; Bell, J.G.; Hendrickx, A.G.; Burns, R.A.; Keen, C.L. 1988. Effect of phytate removal on zinc absorption from soy formula. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 1301-1306.
- Lönnerdal, B.; Kuna, C.; Sandberg, A.-S.; Sandström, B. 1989. Inhibitory effects of various inositol phosphates on zinc and calcium absorption. *J. Nutr.* 119: 211-214.
- Luecke, R.W.; Hofer, J.A.; Brammell; Schmidt, D.A. 1957. Calcium and parakeratosis of swine. *J. Anim. Sci.* 16: 3-11.
- Luecke, R.W.; Hofer, J.A.; Brammell, W.S.; Thorp, F. Jr. 1956. Mineral interrelationships in parakeratosis of swine. *J. Anim. Sci.* 15: 347-351.

- MacDonald, R.S. 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J. Nutr.* 130: 1500S-1508S.
- Machen, M.; Montgomery, T.; Holland, R.; Braselton, E.; Dunstan, R.; Brewer, G.; Yuzbasiyan-Gurkan, V. 1996. Bovine hereditary zinc deficiency: lethal trait A 46. *J. Vet. Diagn. Inv.* 8: 219-227.
- Maclean, K.H. 2005. Chapter 36. Apoptosis by zinc deficiency. In: Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function. Iuchi, S. and Kuldell, N., Eds. Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York. USA. p. 265-271.
- Malcolm-Callis, K.J.; Duff, G.C.; Gunter, S.A.; Kegley, E.B.; Vermeire, D.A. 2000. Effects of supplemental zinc concentrations and source on performance, carcass characteristics, and serum values in finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* 78: 2801-2808.
- Mangian, H.F.; Lee, R.G.; Paul, G.L.; Emert, J.L.; Shay, N.F. 1998. Zinc deficiency suppresses plasma leptin concentrations in rats. *J. Nutr. Biochem.* 9: 47-51.
- Mann, S.O.; Fell, B.F.; Dalgarno, A.C. 1974. Observations on the bacterial flora and pathology of the tongue of sheep deficient in zinc. *Res. Vet. Sci.* 17: 91-101.
- Manning, D.L.; Daly, R.J.; Lord, P.g.; Kelly, K.F.; Green, C.D. 1998. Effects of oestrogen on the expression of a 4.4 kb mRNA in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 59: 205-212.
- Maret, W. 2003. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein-thionein pair. *J. Nutr.* 133: 1460S-1462S.
- Maret, W. 2013. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv. Nutr.* 4: 82-91.
- Maret, W.; Jacob, C.; Valle, B.L.; Fischer, E.H. 1999. Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1936-1940.
- Martin, A.B.; Beker Aydemir, T.; Guthrie, G.J.; Samuelson, D.A.; Chang, S.M.; Cousins, R.J. 2013. Gastric and colonic zinc transporter Zip11 (Slc39a11) in mice responds to dietary zinc and exhibits nuclear localization. *J. Nutr.* 143: 1882-1888.
- Martin, G.B.; White, C.L.; Markey, C.M.; Blackberry, M.A. 1994. Effects of dietary zinc deficiency on the reproductive system of young male sheep: testicular growth and the secretion of inhibin and testosterone. *J. Reprod. Fertil.* 101: 87-96.
- Mason, K.E.; Willard, A.B.; Smith, J.C., Jr. 1982. Testicular damage associated with zinc deficiency in pre- and postpubertal rats: response to zinc repletion. *J. Nutr.* 112: 1019-1028.
- Masters, D.G.; Fels, H.E. 1980. Effect of zinc supplementation on the reproductive performance of grazing merino ewes. *Biol. Trace Elem. Res.* 2: 281-290.
- Masters, D.G.; Keen, C.L.; Lönnerdal, B.; Hurley, L.S. 1983. Zinc deficiency teratogenicity: the protective role of maternal tissue catabolism. *J. Nutr.* 113: 905-912.
- Masters, D.G.; Keen, C.L.; Lönnerdal, B.; Hurley, L.S. 1988. Release of zinc from maternal tissues during zinc deficiency or simultaneous zinc and calcium deficiency in the pregnant rat. *J. Nutr.* 116: 2148-2154.
- Mathie, A.; Sutton, G.; Clarke, C.E.; Veale, E.L. 2006. Zinc and copper: Pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharm. Therap.* 111: 567-583.
- Matsuura, W.; Yamazaki, T.; Yamauchi-Iwai, Y.; Masuda, S.; Nagao, M.; Andrews, G.K.; Kambe, T. 2009. SLC39A9 regulates zinc homeostasis in the secretory pathway: characterization of the ZIP subfamily I protein in vertebrate cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1142-1148.
- Mattson, M.P. 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature*, Nov. 2000: 120-129.

- Mayland, H.F.; Rosenau, R.C.; Florence, A.R. 1980. Grazing cow and calf responses to zinc supplementation. *J. Anim. Sci.* 51: 966-974.
- McBeth, L.J.; Krehbiel, C.R.; Martin, J.J.; Strasia, C.A.; Gill, D.R.; Marham, C.E.; Peterson, R.E.; Reeves, J.M.; Swanek, S.S.; Swenson, C.K. 2002. Effect of zinc level and source on finishing cattle performance and carcass traits. Oklahoma Agricultural Experiment Station, 2002 Animal Science Research Report. <http://www.ansi.okstate.edu/research/2002rr/24/>.
- McCall, K.A.; Huang, C.; Fierke, C.A. 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J. Nutr.* 130: 1437S-1446S.
- McClain, C.J.; Gavaler, J.S.; Van Thiel, D.H. 1984. Hypogonadism in the zinc-deficient rat: localization of the functional abnormalities. *J. Lab. Clin. Med.* 104: 1007-1015.
- McCormick, N.H.; King, J.; Krebs, N.; Soybel, D.I.; Kelleher, S.L. 2015. Redistribution of tissue zinc pools during lactation and dyshomeostasis during marginal zinc deficiency in mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29: 170-175.
- McDowell, L.R. 1992. Minerals in animal and human nutrition. Academic Press. San Diego, CA, USA.
- McGuire, S.O.; Miller, W.J.; Gentry, R.P.; Neathery, M.W.; Ho, S.Y.; Blackmon, D.M. 1985. Influence of high dietary iron as ferrous carbonate and ferrous sulfate on iron metabolism in young calves. *J. Dairy Sci.* 68: 2621-2628.
- McMahan, R.J.; Cousins, R.J. 1998. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4841-4846.
- McNall, A.D.; Etherton, T.D.; Fosmire, G.J. 1995. The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic insulin-like growth factor I and growth hormone receptor genes. *J. Nutr.* 125: 874-879.
- Menard, M.P.; Cousins, R.J. 1983. Zinc transport by brush border membrane vesicles from rat intestine. *J. Nutr.* 113: 1434-1442.
- Miller, E.R.; Luecke, R.W.; Ullrey, D.E.; Blaltzer, B.V.; Bradley, B.L.; Hofer, J.A. 1968. Biochemical, skeletal and allometric changes due to zinc deficiency in the baby pig. *J. Nutr.* 95: 278-286.
- Miller, J.K.; Cragle, R.G. 1965. Gastrointestinal sites of absorption and endogenous secretion of zinc in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 48: 370-373.
- Miller, J.K.; Madsen, F.C.; Holwerda, R.A.; Campbell, M.H. 1996. Zinc may protect periparturient dairy cattle against excessive dietary iron. *Feedstuffs* 68: 12-14.
- Miller, J.K.; Miller, W.J. 1960. Development of zinc deficiency in Holstein calves fed a purified diet. *J. Dairy Sci.* 43: 1854-1856.
- Miller, J.K.; Miller, W.J. 1962. Experimental zinc deficiency and recovery of calves. *J. Nutr.* 76: 467-474.
- Miller, L.V.; Hambidge, K.M.; Naade, V.L.; Hong, Z.; Westcott, J.L.; Fennessey, P.V. 1994. Size of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: alternative techniques for measuring and relation to dietary zinc intake. *J. Nutr.* 124: 268-276.
- Miller, W.J. 1969. Absorption, tissue distribution, endogenous excretion, and homeostatic control of zinc in ruminants. *Am. J. Clin. Nutr.* 22: 1323-1331.
- Miller, W.J. 1970. Zinc nutrition in cattle: a review. *J. Dairy Sci.* 53: 1123-1135.
- Miller, W.J. 1975. New concepts and developments in metabolism and homeostasis of inorganic elements in dairy cattle. A review. *J. Dairy Sci.* 58: 1549-1560.

- Miller, W.J.; Amos, H.E.; Gentry, R.P.; Blackmon, D.M., Durrance, R.M.; Crowe, C.T.; Fielding, A.S.; Neathery, M.W. 1989. Long-term feeding of high zinc sulfate diets to lactating and gestating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72: 1499-1508.
- Miller, W.J.; Blackmon, D.M.; Gentry, R.P.; Pate, F.M. 1970. Effects of high but nontoxic levels of zinc in practical diets on ⁶⁵Zn and zinc metabolism in Holstein calves. *J. Nutr.* 100: 893-902.
- Miller, W.J.; Blackmon, D.M.; Gentry, R.P.; Powell, G.W.; Perkins, H.F. 1966. Influence of zinc deficiency on zinc and dry matter content of ruminant tissues and on excretion of zinc. *J. Dairy Sci.* 49: 1446-1453.
- Miller, W.J.; Clifton, C.M.; Cameron, N.W. 1963. Zinc requirement of Holstein bull calves to nine months of age. *J. Dairy Sci.* 46: 715-719.
- Miller, W.J.; Clifton, C.M.; Fowler, P.R. 1965a. Influence of high levels of dietary zinc on zinc in milk, performance and biochemistry of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 48: 450-453.
- Miller, W.J.; Pitts, W.J.; Clifton, C.M.; Morton, J.D. 1965b. Effects of zinc deficiency per se on feed efficiency, serum alkaline phosphatase, zinc in skin, behavior, greying, and other measurements in the Holstein calf. *J. Dairy Sci.* 48: 1329-1334.
- Miller, W.J.; Pitts, W.J.; Clifton, C.M.; Schmittle, S.C. 1964. Experimentally produced zinc deficiency in the goat. *J. Dairy Sci.* 47: 556-558.
- Miller, W.J.; Powell, G.W., Hiers, J.M., Jr. 1966. Influence of zinc deficiency on dry matter digestibility in ruminants. *J. Dairy Sci.* 49: 1012-1013.
- Miller, W.J.; Powell, G.W.; Pitts, W.J.; Perkins, H.F. 1965c. Factors affecting zinc content of bovine hair. *J. Dairy Sci.* 48: 1091-1095.
- Mills, C.F. 1978. Zinc in ruminant nutrition. The Rowett Research Institute. Annual Report of Studies in Animal Nutrition and Allied Sciences. 34: 105-115.
- Mills, C.R.; Dalgarno, A.C. 1967. The influence of dietary calcium concentration on epidermal lesions of zinc deficiency in lambs. *Proc. Nutr. Soc.* 26: XIX.
- Mills, C.F.; Dalgarno, A.C., Williams, R.B., Quarterman, J. 1967. Zinc deficiency and the zinc requirements of calves and lambs. *Br. J. Nutr.* 21:751-768.
- Milne, D.B.; Canfield, W.K.; Mahalko, J.R.; Sandstead, H.H. 1983. Effect of dietary zinc on whole body surface loss of zinc: impact on estimation of zinc retention by balance method. *Am. J. Clin. Nutr.* 38: 181-186.
- Minatel, L.; Buffarini, M.A.; Dallorso, M.E.; Homse, A.; Carfagnini, J.C. 1998. Relevamiento mineral de bovinos de la región noroeste de la provincia de Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18: 67-75.
- Mohanna, C.; Nys, Y. 1999. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytases. *Anim. Feed Sci. Techn.* 77: 241-253.
- Momcilovic, B.; Belonje, B.; Giroux, A.; Shah, B.G. 1975. Total femur zinc as the parameter of choice for a zinc bioassay in rats. *Nutr. Rep. Int.* 12: 197.
- Moulder, K.; Steward, M.W. 1989. Experimental zinc deficiency: effects on cellular responses and the affinity of humoral antibody. *Clin. Exp. Immunol.* 77: 269-274.
- Mufarrege, D.; Somma de Feré, G.; Homse, A. 1983. Nutrición mineral del ganado en la jurisdicción de la E.E.A. Mercedes (Corrientes). Actas de la Reunión de especialistas en nutrición mineral del ganado. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4 (supl. 3): 5-11.
- Mullis, L.A.; Spears, J.W.; McCraw, R.L. 2003. Effects of breed (Angus vs Simmental) and copper and zinc source on mineral status of steers fed high dietary iron. *J. Anim. Sci.* 81: 318-322.

- Mutch, P.B.; Hurley, L.S. 1974. Effect of zinc deficiency during lactation on postnatal growth and development of rats. *J. Nutr.* 828-842.
- Nagaraja, T.G.; Titgemeyer, E.C. 2007. Ruminant acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional Outlook. *J. Dairy Sci.* 90: E17-E38.
- National Research Council. 1982. United States-Canadian Tables of Feed Composition. 3rd Ed. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- National Research Council. 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th Ed. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Seventh Revised Edition. National Academy Press. Washington, D.C. USA.
- National Research Council. 2005. Mineral Tolerance of Domestic Animals. Second Revised Edition. National Academies Press, Washington, D.C., USA.
- National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants. National Academies Press, Washington, D.C., USA.
- National Research Council. 2012. Nutrient Requirements of Swine. 11th Ed. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- Nayeri, A.; Upah, N.C.; Sucu, E.; Sanz-Fernández, M.V.; DeFrain, J.M.; Gorden, P.J.; Baumgard, L.H. 2014. Effect of the ratio of zinc amino acid complex to zinc sulphate on the performance of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 97: 4392-4404.
- Neathery, M.W.; Miller, W.J.; Blackmon, D.M.; Gentry, R.P. 1973a. Zinc-65 metabolism, secretion into milk, and biological half-life in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 56: 1526-1530.
- Neathery, M.W.; Miller, W.J.; Blackmon, D.M.; Pate, F.M.; Gentry, R.P. 1973b. Effects of long term zinc deficiency on feed utilization, reproductive characteristics, and hair growth in the sexually mature male goat. *J. Dairy Sci.* 56: 98-105.
- Neiva, M.G.S.; Da Mota, D.L.; Batista, V.A.M.; Sousa-Rodrigues, C.F. 2006. Mucous membrane of the rumen of ovines fed with spineless forage cactus or palm (Barbary Fig) (*Opuntia ficus indica* Mil): Histochemical study by means of light microscopy. *Int. J. Morphol.* 24: 723-728.
- Nelson, D.R.; Wolff, W.A.; Blolgett, D.J.; Luecke, B.; Ely, R.W.; Zacchary, J.F. 1984. Zinc deficiency in sheep and goats: three field cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 1480-1485.
- Nielsen, F.H. 2012. History of zinc in agriculture. *Adv. Nutr.* 3: 783-789.
- Ninh, N.X.; Thissen, J-P; Maiter, D.; Adam, E.; Mulumba, N.; Ketelslegers, J.M. 1995. Reduced liver insuline-like growth factor-I gene expression in young zinc-deprived rats is associated with a decrease in liver growth hormone (GH) receptors and serum GH-binding proteins. *J. Endocrinol.* 144: 449-456.
- Nitzan, Y.B.; Sekler, I.; Hershinkel, M.; Moran, A.; Silverman, W.F. 2002. Postnatal regulation of Zn-T1 expression in the mouse brain. *Dev. Brain Res.* 137: 149-157.
- Nockels, C.F.; DeBonis, J.; Torrent, J. 1993. Stress induction affects copper and zinc balance in calves fed organic and inorganic copper and zinc sources. *J. Anim. Sci.* 71: 2539-2545.
- Noh, S.K.; Koo, S.I. 2001. Intraduodenal infusion of lysophosphatidylcholin restores the intestinal absorption of vitamins A and E in rats fed a low-zinc diet. *Exp. Biol. Med.* 226: 342-348.
- Norrdin, R.W.; Krook, L.; Pond, W.G.; Walker, E.F. 1973. Experimental zinc deficiency in weanling pigs on high and low calcium diets. *Cornell Vet.* 63: 264-290.

- Oberleas, D.; Muhrer, M.E.; O'Dell, B.L. 1962. Effects of phytic acid on zinc availability and parakeratosis in swine. *J. Anim. Sci.* 21: 57-61.
- O'Brien, K.O.; Zavaleta, N.; Caulfield, L.E.; Wen, J.; Abrams, S.A. 2000. Prenatal iron supplements impair zinc absorption in pregnant Peruvian women. *J. Nutr.* 130: 2251-2255.
- O'Dell, B.L. 1984. Bioavailability of trace elements. *Nutr. Rev.* 42: 301-308.
- O'Dell, B.L. 2000. Role of zinc in plasma membrane function. *J. Nutr.* 130: 1432S-1436S.
- O'Dell, B.L.; Browning, J.D.; Reeves, P.G. 1987. Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. *J. Nutr.* 1117: 1883-1889.
- O'Dell, B.L., Corley-Harrison, J.; Besch-Williford, C.; Browning, J.D.; O'Brien, D. 1990a. Zinc status and peripheral nerve function in guinea pigs. *FASEB J.* 4: 2919-2923.
- O'Dell, B.L., Corley-Harrison, J.; Browning, J.D.; Besch-Williford, C.; Hempe, J.M., Savage, J.E. 1990b. Zinc deficiency and peripheral neuropathy in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194: 1-4.
- O'Dell, B.L.; Newberne, P.M.; Savage, J.E. 1958. Significance of dietary zinc for the growing chicken. *J. Nutr.* 65: 503-523.
- O'Dell, B.L.; Reeves, P.G. 1989. Zinc status and food intake. In: *Zinc in human biology*. C.F. Mills, Ed. Springer-Verlag, London. p. 173-181.
- O'Dell, B.L.; Savage, J.E. 1960. Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103: 304-306.
- O'Dell, B.L.; Yoke, J.M.; Savage, J.E. 1964. Zinc availability in the chick as affected by phytate, calcium and ethylenediaminetetraacetate. *Poultry Sci.* 43: 415-419.
- Okada, S.; Abuyama, M.; Yamamoto, R.; Kondo, T.; Narukawa, M.; Misaka, T. 2013. Dietary zinc status reversibly alters both the feeding behaviors of the rats and gene expression patterns in diencephalon. *Biofactors* 38: 203-218.
- Orr, C.L.; Hutcheson, D.P.; Graingers, R.B.; Cummins, J.M.; Mock, R.E. 1990. Serum copper, zinc, calcium and phosphorus concentrations of calves stressed by bovine respiratory disease and infectious bovine rhinotracheitis. *J. Anim. Sci.* 68: 2893-2900.
- Orskov, E.R.; McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 92: 499-503.
- Oteiza, P.I.; Hurley, L.S.; Lonnerdal, B.; Kenn, C.L. 1990. Effects of marginal zinc deficiency on microtubule polymerisation in the developing rat brain. *Biol. Trace Elem. Res.* 24: 13-23.
- Ott, E.A.; Smith, W.H.; Stob, M.; Beeson, W.M. 1964. Zinc deficiency syndrome in the young lamb. *J. Nutr.* 82: 41-50.
- Ott, E.A.; Smith, W.H.; Stobb, M.; Parker, H.E.; Harrington, R.B.; Beeson, W.M. 1965b. Zinc requirement of the growing lamb fed a purified diet. *J. Nutr.* 87: 459-463.
- Ott, E.A.; Smith, W.H.; Stobb, M.; Parker, H.E.; Beeson, W.M. 1965a. Zinc deficiency syndrome in the young calf. *J. Anim. Sci.* 24: 735-741.
- Ott, E.A.; Smith, W.H., Harrington, R.B.; Beeson, W.M. 1966. Zinc toxicity in ruminants. II. Effect of high levels of dietary zinc on gains, feed consumption and feed efficiency of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 25: 419-423.
- Ott, E.S.; Shay, N.F. 2001. Zinc deficiency reduces leptin gene expression and leptin secretion in rat adipocytes. *Exp. Biol Med.* 226: 841-846.
- Outten, C.E.; O'Halloran, T.V. 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292: 2488-2492.

- Overbeck, S.; Uciechowski, P.; Ackland, M.L.; Ford, D.; Rink, L. 2008. Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9. *J. Leuk. Biol.* 83: 368-390.
- Páez, X.; Mayers, R.D. 1991. Insatiable feeding evoked in rats by recurrent perfusion of neuropeptide Y in hypothalamus. *Peptides* 12: 609-616.
- Palmiter, R.D. 2004. Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4918-4923.
- Palmiter, R.D.; Findley, S.D. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14: 639-649.
- Panemangalore, M.; Bebe, F.N. 1997. Chapter 12. Zinc diets: deficiency and excess. In: *Trace elements in laboratory rodents*. R.R. Watson, Ed. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA. p. 191-214.
- Paoletti, P.; Vergnano, A.M., Barbour, B.; Casado, M. 2009. Zinc at glutamergic synapses. *Neuroscienc* 158: 126-136.
- Park, J.H.; Grandjean, C.J.; Antonson, D.L.; Vanderhoof, J.A. 1986. Effects of isolated zinc deficiency on the composition of skeletal muscle, liver and bone during growth in rats. *J. Nutr.* 116: 610-617.
- Parry, W.H. 1977. Distribution of protein-bound zinc in normal and zinc-deficient lamb plasma. *Nutr. Metab.* 21 (suppl. 1): 48-49.
- Parul, C.; West, K.P., Jr. 1998. Interactions between zinc and vitamin A: an uptake. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (suppl.): 435S-441S.
- Payne, R.L.; Bidner, T.D.; Fakler, T.M.; Southern, L.L. 2006. Growth and intestinal morphology of pigs from sows fed two zinc sources during gestation and lactation. *J. Anim. Sci.* 84: 2141-2149.
- Pechin, G.H.; Cseh., S.; Corbellini, C.N.; Idiart, J.L.; Moralejo, R.; Visconti, M.; Drake, M.; Yarrar, M. 1995. Estudio de las deficiencias minerales en bovinos de carne en el departamento Maracó, provincia de La Pampa, Argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15: 492-494.
- Pechin, G.H.; Corbellini, C.N.; Cseh, S.B.; Meglia, G.E.; Vergara, L.A.; Tossoni, R.A.; Moralejo, R.H. 2001. Efecto de la suplementación con óxido de zinc en bovinos para carne alimentados con forrajes marginalmente deficientes en zinc. *Rev. Med. Vet.* 82: 308-311.
- Perederina, A.; Esakova, O.; Quan, C.; Khanova, E.; Krasilnikov, A.S. 2010. Eukariotic ribonucleases P/MRP: the cristal structure of the P3 domain. *EMBO J.* 29: 761-769.
- Peres, J.M.; Bureau, F.; Neuville, D.; Arhan, P.; Bougle, D. 2001. Inhibition of zinc absorption by iron depends on their ratio. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15: 237-241.
- Perkin Elmer. 1996. Analytical methods for atomic absorption spectroscopy. The Perkin-Elmer Corporation. Branford, Connecticut (USA). 300 p.
- Perry, T.W.; Beeson, W.M.; Smith, W.H.; Mohler, M.T. 1968. Value of zinc supplementation of natural rations for fattening beef cattle. *J. Anim. Sci.* 27: 1674-1677.
- Pesce, L.; Bermúdez, J.; Bonino, J.; Rimbaud, E.; Hirigoyen, D. 1992. Enfermedades podales de los rumiantes. *Hemisferio Sur*.
- Peters, J.L.; Dufner-Beattie, J.; Xu, W.; Geiser, J.; Lahenr, B.; Salt, D.E.; Andrews, G.K. 2007. Targeting of the mouse *Slc39a2* (*Zip2*) gene reveals highly cell-specific patterns expression, and unique functions in zinc, iron, and calcium homeostasis. *Genesis* 45: 339-352.
- Pierce, S.K.; Politis, A.D. 1990. Ca^{2+} -activated cell volume recovery mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 27-42.

- Petkovic, V.; Miletta, M.C.; Eblé, D.; Iliev, D.I.; Binder, G.; Flück, C.E.; Mullis, P.E. 2013. Effect of zinc binding residues in growth hormone (GH) and altered intracellular zinc content on regulated GH secretion. *Endocrinology* 154: 4215-4225.
- Pierson, R.E. 1966. Zinc deficiency in young lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 149: 1279-1282.
- Pinter, T.B.; Stillman, M.J. 2014. The zinc balance: competitive zinc metalation of carbonic anhydrase and metallothionein 1A. *Biochemistry* 53: 6276-6285.
- Piper, K.G.; Higgins, G. 1967. Estimation of trace metals in biological material by atomic absorption spectrophotometry. *Proc. Assoc. Clin. Biochem.* 4: 190-195.
- Pitts, W.J.; Miller, W.J.; Fosgate, O.T.; Morton, J.D.; Clifton, C.M. 1966. Effect of zinc deficiency and restricted feeding from two to five months of age on reproduction in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 49: 995-1000.
- Plum, L.M.; Rink, L.; Haase, H. 2010. The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7: 1342-1365.
- Pogge, D.J.; Drewnoski, M.E.; Hansen, S.L. 2014. High dietary sulphur decreases the retention of copper, manganese, and zinc in steers. *J. Anim. Sci.* 92: 2182-2191.
- Pond, W.G. 1983. Effect of dietary calcium and zinc levels on weight gain and blood and tissue mineral concentrations of growing Columbia- and Suffolk- sired lambs. *J. Anim. Sci.* 56: 952-959.
- Pond, W.G.; Wallace, M.H. 1986. Effect of gestation-lactation diet calcium and zinc levels and of parenteral vitamins A, D and E during gestation on ewe body weight and lamb weight and survival. *J. Anim. Sci.* 63: 1029-1025.
- Poulsen, H.D. 1995. Zinc oxide for weanling piglets. *Acta Agric. Scand. Sect. A, Anim. Sci.* 45: 159-167.
- Powell, S.R. 2000. The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* 130: 1447S-1454S.
- Prabowo, A.; Spears, J.W.; Goode, L. 1988. Effects of dietary iron on performance and mineral utilization in lambs fed a forage-based diet. *J. Anim. Sci.* 66: 2028-2035.
- Prasad, A. 2000. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J. Infect. Dis.* (suppl. 1): S62-S68.
- Prasad, A. 2007. Zinc: Mechanisms of host defense. *J. Nutr.* 137: 1345-1349.
- Prasad, A. 2013. Discovery of zinc human deficiency: its impact on human health and disease. *Adv. Nutr.* 4: 176-190.
- Prasad, A. 2014. Zinc: An antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc in degenerative disorders of aging. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 28: 364-371.
- Prasad, A.; Meftah, S.; Abdallah, J.; Kaplan, J.; Brewer, G.J.; Bach, J.F.; Dardenne, M. 1988. Serum thymulin in human zinc deficiency. *J. Clin. Inv.* 82: 1202-1210.
- Prasad, C.S.; Arora, S.P. 1979. Influence of dietary zinc on β -carotene conversion and on the level of retinol binding protein in the blood serum. *Indian J. Dairy Sci.* 32: 275-279.
- Puchala, R.; Sahlu, T.; Davis, J.J. 1999. Effects of zinc-methionine on performance of Angora goats. *Small Rum. Res.* 33: 1-8.
- Qian, W.J., Aspinwall, C.A.; Battiste, M.A.; Kennedy, R.T. 2000. Detection of secretion from single pancreatic beta-cells using extracellular fluorogenic reactions and confocal fluorescence microscopy. *Anal. Chem.* 72: 711-717.
- Rahman, A.S.; Kimura, M.; Yokoi, K.; Naher, T.E.; Itokaya, Y., Tanvir-Naher, E. 1995. Iron, zinc, and copper levels in different tissues of clinically vitamin A-deficient rats. *Biol. Trace Element Res.* 49: 75-84.

- Rains, T.M.; Shay, N.F. 1995. Zinc status specifically changes preferences for carbohydrate and protein in rats selecting from separate carbohydrate-, protein-, and fat-containing diets. *J. Nutr.* 2874-2879.
- Record, I.R.; Tulsi, R.S.; Dreosti, I.E.; Fraser, F.J. 1985. Cellular necrosis in zinc-deficient rat embryos. *Teratology* 32: 397-405.
- Reed, S.; Qin, X.; Ran-Ressler, R.; Brenna, J.T.; Glahn, R.P.; Tako, E. 2014. Dietary zinc deficiency affects blood linoleic acid:dhomo- γ -linoleic acid (LA:DGLA) ratio; a sensitive physiological marker of zinc status *in vivo* (*Gallus gallus*). *Nutrients* 6: 1164-1180.
- Reeves, P.G. 1995. Adaptation responses in rats to long-term feeding of high-zinc diets: emphasis on intestinal metallothionein. *J. Nutr. Biochem.* 6: 48-54.
- Reeves, P.G. 1998. Copper metabolism in metallothionein-null mice fed a high-zinc diet. *J. Nutr. Biochem.* 9: 598-601.
- Reeves, P.G. 2003. Patterns of food intake and self-selection of macronutrients in rats during short-term deprivation of dietary zinc. *J. Nutr. Biochem.* 14: 323-243.
- Reeves, P.G.; Rossow, K.L. 1996. Zinc-and/or cadmium-induced intestinal metallothionein and copper metabolism in adult rats. *J. Nutr. Biochem.* 7: 128-134.
- Reeves, P.G.; Rossow, K.L.; Bobilya, D.J. 1993. Zinc-induced metallothionein and copper metabolism in intestinal mucosa, liver, and kidney of rats. *Nutr. Res.* 13: 1419-1431.
- Reggiani, P.C.; Morel, G.R.; Cónsole, G.M.; Barbeito, C.G.; Rodríguez, S.S.; Brown, O.A.; Bellini, M.J.; Pléau, J.-M.; Dardenne, M.; Goya, R.G. 2009. The thymus-neuroendocrine axis: Physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1153: 98-106.
- Reid, R.L.; Horvath, D.J. 1980. Soil chemistry and mineral problems in farm livestock. A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 5: 95-167.
- Revy, P.S.; Jondreville, C.; Dourmad, J.Y.; Guinotte, F.; Nys, Y. 2002. Bioavailability of two sources of zinc in weanling pigs. *Anim. Res.* 51: 315-326.
- Revy, P.S.; Jondreville, C.; Dourmad, J.Y.; Nys, Y. 2004. Effect of zinc supplemented as either an organic or an inorganic source and of microbial phytase on zinc and other minerals utilization by weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116: 93-112.
- Rink, L.; Gabriel, P. 2000. Zinc and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 541-552.
- Rink, L.; Kirchner, H. 2000. Zinc-altered immune function and cytokine production. *J. Nutr.* 130: 1407S-1411S.
- Ritchie, H.D.; Luecke, R.W.; Baltzer, B.V.; Miller, E.R.; Ullrey, D.E.; Hofer, J.A. 1963. Copper and zinc interrelationships in the pig. *J. Nutr.* 79: 117-123.
- Roberson, K.D.; Edwards, H.M., Jr. 1994. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler chicks. *Poultry Sci.* 73: 1312-1326.
- Rojas, L.X.; McDowell, L.R.; Cousins, R.J.; Martin, F.G.; Wilkinson, N.S.; Johnson, A.B.; Velasquez, J.B. 1995. Relative bioavailability of two organic and two inorganic zinc sources fed to sheep. *J. Anim. Sci.* 73: 1202-1207.
- Root, A.W.; Duckett, G.; Sweetland, M.; Reiter, E.O. 1979. Effect on zinc deficiency upon pituitary function in sexually mature and immature male rats. *J. Nutr.* 109: 958-964.
- Rossi, L.; Migliaccio, S.; Corsi, A.; Marzia, M.; Blanco, P.; Teti, A.; Gambelli, L.; Clanfarani, S.; Paoletti, F.; Branca, F. 2001. Reduced growth and skeletal changes in zinc-deficient growing rats are due to impaired growth plate activity and inanition. *J. Nutr.* 131: 1142-1146.
- Ruksan, B.E. 1985. Mapa de microelementos en forrajeras de Argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4 (supl. 3): 89-98.

- Ruz, M.; Cavan, K.R.; Bettger, W.J.; Gibson, R.S. 1992. Erythrocytes, erythrocytes membranes, neutrophils and platelets as biopsy materials for the assessment of zinc status in humans. *Br. J. Nutr.* 68: 515-527.
- Salomons, N.W.; Jacob, R.A. 1981. Studies on the bioavailability of zinc in humans: effects of heme and nonheme iron on the absorption of zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 475-482.
- Sandoval, M.; Henry, P.R.; Ammermann, C.B.; Miles, R.D.; Littell, R.C. 1997a. Relative bioavailability of supplemental inorganic zinc sources for chicks. *J. Anim. Sci.* 75: 3195-3205.
- Sandoval, M.; Henry, P.R.; Littell, R.C.; Cousins, R.J. Ammerman, C.B. 1997b. Estimation of the relative bioavailability of zinc from inorganic zinc sources for sheep. *Anim. Feed Sci. Tech.* 66: 223-235.
- Sandstead, H.H. 1995. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 621S-624S.
- Sandstead, H.H. 2013. Human zinc deficiency: discovery to initial translation. *Adv. Nutr.* 4: 76-81.
- Sandstead, H.H.; Frederikson, C.J.; Penland, J.G. 2000. History of zinc as related to brain function. *J. Nutr.* 130: 496S-502S.
- Sandstrom, B.; Sandberg, A.S. 1992. Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *J. Trace Elements Electro. Health Dis.* 6: 99-103.
- Sanecki, R.K.; Corbin, J.E.; Forbes, R.M. 1985. Extracutaneous histologic changes accompanying zinc deficiency in pups. *Am. J. Vet. Res.* 46: 2120-2123.
- Saraswat, R.C.; Arora, S.P. 1972. Effect of dietary zinc on the vitamin A level and alkaline phosphatase activity in blood sera of lambs. *Indian J. Anim. Sci.* 42: 358-362.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide. Cary, NC, USA.
- Sato, F.; Watanabe, T.; Hoshi, E.; Endo, A. 1985. Teratogenic effect of maternal zinc deficiency and its co-teratogenic effect of cadmium. *Teratology* 31: 13-18.
- Sato, M.; Bremner, I. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* 14: 325-337.
- Sato, M.; Mehra, R.K.; Bremner, I. 1984. Measurement of plasma metallothionein-I in the assesment of the zinc status of zinc-deficient and stressed rats. *J. Nutr.* 114: 1683-1689.
- Saylor, W.W.; Morrow, F.D.; Leach, R.M., Jr. 1980. Copper- and zinc-binding proteins in sheep liver and intestine: effects of dietary levels of the metals. *J. Nutr.* 110: 460-468.
- Schell, T.C.; Kornegay, E.T. 1996. Zinc concentration in tissues and performance of weaning pigs fed pharmacological levels of zinc from ZnO, Zn-methionine, Zn-lysine, or ZnSO₄. *J. Anim. Sci.* 74: 1584-1593.
- Schlegel, P.; Nys, Y.; Jondreville, C. 2010. Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source. *Animal*: 200-209.
- Schlegel, P.; Windisch, W. 2006. Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with Zn labeled rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berlin)* 90: 216-222.
- Scion Corporation. Scion Image for Windows. Frederick, Mariland, USA.
- Seal, C.J.; Heaton, F.W. 1983. Chemical factors affecting intestinal absorption of zinc *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Nutr.* 50: 317-324.
- Seal, C.J.; Mathers, J.C. 1989. Intestinal zinc transfer by everted gut sacs from rats given diets containing different amounts and types of dietary fibre. *Br. J. Nutr.* 62: 151-163.

- Sekler, I.; Sensi, S.L.; Hershinkel, M.; Silverman, W.F. 2007. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol. Med.* 13: 337-343.
- Selvais, P.L.; Labuche, C.; Ninh, N.X.; Ketelslegers, J.-M.; Deneff, J.-F.; Maiter, D.M. 1997. Cyclic feeding behaviour and changes in hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression induced by zinc deficiency in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 9: 55-62.
- Selle, P.H.; Ravindran, V. 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Sc.* 113: 99-122.
- Shankar, A.H.; Prasad, A.S. 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (suppl.): 447S-463S.
- Shanklin, S.H.; Miller, E.R.; Ullrey, D.E.; Hofer, J.A.; Luecke, R.W. 1968. Zinc requirements of baby pigs on casein diets. *J. Nutr.* 96: 101-108.
- Sharif, R.; Thomas, P.; Zalewsky, P.; Fenech, M. 2012. The role of zinc in genomic stability. *Mutat. Res. – Fund. Mol. M.* 733: 111-121.
- Shay, N.F.; Cousins, R.J. 1993. Cloning of rat intestinal mRNAs affected by zinc deficiency. *J. Nutr.* 123: 35-41.
- Shay, N.F.; Mangian, H.F. 2000. Neurobiology of zinc-influenced eating behavior. *J. Nutr.* 130: 1493-1499.
- Shaw, N.A.; Dickey, H.C.; Brugman, H.M.; Blamberg, D.L.; Witter, J.F. 1974. Zinc deficiency in the female rabbits. *Lab. Anim.* 8: 1.7.
- Shyamala, G.; Yeh, Y.F. 1975. Is the estrogen receptor of mammary glands a metallo-protein? *Biochem. Biophys. Res. Com.* 64: 408-415.
- Sian, L.; Mingyan, X.; Miller, L.V.; Tong, L.; Krebs, N.F.; Hambidge, K.M. 1996. Zinc absorption and intestinal losses of endogenous zinc in young Chinese women with marginal zinc intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 348-353.
- Siciliano-Jones, J.L.; Socha, M.T.; Tomlinson, D.J.; DeFrain, J.M. 2008. Effect of trace mineral source on lactation performance, claw integrity, and fertility of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91: 1985-1995.
- Sim, D.L.; Yeo, W.M.; Chow, V.T. 2002. The novel human HUEL (C4orf1) protein shares homology with the DNA-binding domain of the WPA DNA repair protein and displays nuclear translocation in a cell cycle-dependent manner. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34: 487-504.
- Simpson, C.J.; Wise, A. 1990. Binding of zinc and calcium to inositol phosphates (phytate) in vitro. *Br. J. Nutr.* 64: 225-232.
- Smith, B.L.; Embling, P.P.; Towers, N.R.; Wright, D.E.; Payne, E. 1977. The protective effect of zinc sulphate in experimental sporidesmin poisoning of sheep. *New Zeal. Vet. J.* 25: 124-127.
- Smith, J.C., Jr.; Brown, E.D.; McDaniel, E.G.; Chan, W. 1976. Alterations in vitamin A metabolism during zinc deficiency and food and growth restriction. *J. Nutr.* 106: 569-574.
- Smith, J.C., Jr.; McDaniel, E.G.; Fan, F.F.; Halsted, J.A. 1973. Zinc: A trace element essential in vitamin A metabolism. *Science* 181: 954-955.
- Smith, K.T.; Cousins, R.J. 1980. Quantitative aspects of zinc absorption by isolated, vascularly perfused rat intestine. *J. Nutr.* 110: 316-323.
- Somers, M.; Underwood, E.J. 1969. Studies of zinc nutrition in sheep. II. The influence of zinc deficiency in ram lambs upon the digestibility of the dry matter and the utilization of the nitrogen and sulphur of the diet. *Aust. J. Agric. Res.* 20: 899-903.

- Song, M.K.; Adham, N.F. 1985. Relationship between zinc and prostaglandin metabolisms in plasma and small intestine of rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 41: 1201-1209.
- Spais, A.G.; Papasteriadis, A.A. 1974. Zinc deficiency in cattle under Greek conditions. In: Oekstra, W.G.; Suttie, J.W.; Ganther, E.E. y Mertz, W. (Eds.). *Trace element metabolism in animals-2*. Baltimore. University Park Press. p. 628-631.
- Spallholz, J.E.; Stewart, J.R. 1989. Advances in the role of minerals in immunobiology. *Biol. Trace Elem. Res.* 19: 129-151.
- Spears, J.W. 1989. Zinc methionine for ruminants: relative bioavailability of zinc in lambs and effects on growth and performance of growing heifers. *J. Anim. Sci.* 67: 835-843.
- Spears, J.W.; Kegley, E.B. 1991. Effect of zinc and manganese methionine on performance of beef cows and calves. *J. Anim. Sci.* 69 (suppl. 1): 59 (Abstract).
- Spears, J.W.; Kegley, E.B. 2002. Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 80: 2747-2752.
- Spears, J.W.; Harvey, R.W.; Brown, T.T. 1991. Effects of zinc methionine and zinc oxide on performance, blood characteristics and antibody titers response to viral vaccination in estressed feeder calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 1731-1733.
- Spears, J.W.; Schlegel, P.; Seal, M.C.; Lloyd, K.E. 2004. Bioavailability of zinc sulfate and different organic zinc sources and their effectos on ruminal volatile fatty acid proportions. *Livest. Prod. Sci.* 90: 211-217.
- Stafford, S.L.; Bokil, N.J.; Achard, M.E.S.; Kapetanovic, R.; Schembri, M.A.; McEwan, A.G.; Sweet, M.J. 2013. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci. Rep.* 33: 541-554.
- Stake, P.E.; Miller, W.J.; Blackmon, D.M.; Gentry, R.P.; Neathery, M.W. 1974. Role of pancreas in endogenous zinc excretion in the bovine. *J. Nutr.* 104: 1279-1284.
- Stake, P.E.; Miller, W.J.; Neathery, M.W.; Gentry, R.P. 1975. Zinc-65 absorption and tissue distribution in two-, and siw-month-old Holstein calves and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 58: 78-81.
- Stamenkovic, I. 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metallo-proteinases. *J. Pathol.* 200: 448-464.
- Standish, J.F.; Ammerman, C.B. 1971. Effect of excess dietary iron as ferrous sulfate and ferric citrate on tissue mineral composition of sheep. *J. Anim. Sci.* 33: 481-484.
- Standish, J.F.; Ammerman, C.B.; Palmer, A.Z.; Simpson, C.F. 1971. Influence of dietary iron and phosphorus on performance, tissue mineral composition and mineral absorption in steers. *J. Anim. Sci.* 33: 171-178.
- Standish, J.F.; Ammerman, C.B.; Simpson, C.F.; Neal, F.C.; Palmer, A.Z. 1969. Influence of graded levels of dietary iron, as ferrous sulfate, on performance and tissue mineral composition of steers. *J. Anim. Sci.* 29: 496-503.
- Star, L.; van der Klis, J.D.; Rapp, C.; Ward, T.L. 2012. Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers. *Poult. Sci.* 91: 3115-3120.
- Steel, L.; Cousins, R.J. 1985. Kinetics of zinc absorption by luminally and vascularly perfused rat intestine. *Am. J. Physiol* 248: G46-G53.
- Steel, M.A.; AlZahal, O.; Hook, S.E.; Croom, J.; McBride, B.W. 2009. Ruminant acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report. *Acta Vet. Scand.* 51: 39-44.

- Steele, M.A., Greenwood, S.L.; Croom, J.; McBride, B.W. 2012. An increase in dietary non-structural carbohydrates alters the structure and metabolism of the rumen epithelium in lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 92: 123-130.
- Suhy, D.A.; Simon, K.D.; Linzer, D.I.; O'Halloran, T.V. 1999. Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J. Biol. Chem.* 274: 9183-9192.
- Sunderman, F.W. 1995. The influence of zinc on apoptosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 25: 134-142.
- Suttle, N.F. 2010. Mineral nutrition of Livestock. Fourth Edition. CAB International. Wallingford. UK.
- Suzuki, T.; Ishihara, K.; Migaki, H.; Ishihara, K.; Nagao, M.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Kambe, T. 2005. Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J. Biol. Chem.* 280: 30956-30962.
- Swenerton, H.; Hurley, L.S. 1968. Severe zinc deficiency in male and female rats. *J. Nutr.* 95: 8-18.
- Swinkels, J.W.G.M.; Kornegay, E.T.; Verstegen, M.W.A. 1994. Biology of zinc and biological value of dietary organic zinc complexes and chelates. *Nutr. Res. Rev.* 7: 129-149.
- Swinkels, J.W.G.M.; Kornegay, E.T.; Zhou, W.; Lindemann, M.D.; Webb, K.E., Jr.; Verstegen M.W. 1996. Effectiveness of a zinc amino acid chelate and zinc sulfate in restoring serum and soft tissue zinc concentrations when fed to zinc-depleted pigs. *J. Anim. Sci.* 74: 2420-2430.
- Tacnet, F.; Watkins, D.W.; Ripoché, P. 1990. Studies of zinc transport into brush-border membrane vesicles isolated from pig small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1024: 323-330.
- Tamura, T.; Goldenberg, R.L. 1996. Zinc nutrition and pregnancy outcome. *Nutr. Res.* 16: 139-181.
- Taylor, K.M.; Morgan, H.E.; Johnson, A.; Nicholson, R.I. 2004. Structure-function analysis of HKE4, a member of the new LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochem. J.* 377: 131-139.
- Taylor, K.M.; Nicholson, R.I. 2003. The LZT proteins; the new LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1611:1630.
- Todd, W. R.; Elvehjem, C.A.; Hart, E.B. 1934. Zinc in the nutrition of the rat. *Amer. J. Physiol.* 107: 146-156.
- Tóth, K. 2012. Zinc in neurotransmission. *Annu. Rev. Nutr.* 31: 139-153.
- Tominaga, K.; Kagata, T.; Johmura, Y., Hishida, T., Nishizuka, M.; Imagawa, M. 2005. SLC39A14, a LZT protein, is induced in adipogenesis and transports zinc. *FEBS J.* 272: 1590-1599.
- Tran, C.; Gopalsamy, G.L.; Mortimer, E.K.; Young, G.P. 2015. The potential for zinc stable isotope techniques and modeling to determine optimal zinc supplementation. *Nutrients* 7: 4271-4295.
- Treves, S.; Trentini, P.L.; Ascanelli, M.; Bucci, G.; Di Virgilio, F. 1994. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* 211: 339-343.
- Truong-Tran, A.Q.; Ho, L.H.; Chai, F.; Zalewsky, P.D. 2000. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J. Nutr.* 130: 1459S-1466S.

- Tucker, H.F.; Salmon, W.D. 1955. Parakeratosis or zinc deficiency disease in the pig. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 88: 613-616.
- Underwood, E.J. 1981. *The mineral nutrition of livestock*. Second Edition. CAB, London.
- Underwood, E.J.; Somers, M. 1969. Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams. *Aust. J. Agric. Res.* 20: 889-897.
- Underwood, E.J.; Suttle, N.F. 1999. *The mineral nutrition of livestock*. Third Edition. CABI Publishing. UK.
- Valle, B.L. 1986. A synopsis of zinc biology and pathology in zinc enzymes. Bertini, I. and Gary, H.B., Eds. Birkhauser, Boston, USA.
- Vallee, B.L.; Auld, D.S. 1990. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochem.* 29: 5647-5659.
- Vallee, B.L.; Auld, D.S. 1993. New perspectives on zinc biochemistry: cocatalytic sites in multi-zinc enzymes. *Biochem.* 32: 6493-6500.
- Van Campen, D.R. 1969. Copper interference with the intestine absorption of Zn-65 in rats. *J. Nutr.* 97: 104-108.
- Van Campen, D.R.; House, W.A. 1974. Effect of a low protein diet on retention of an oral dose of ⁶⁵Zn and on tissue concentrations of zinc, iron, and copper in rats. *J. Nutr.* 104: 84-90.
- Vandergrift, B. 1992. The theory and practice of mineral proteinates in the animal feed industry. *Proceedings of Alltech's Eighth Annual Symposium*. Alltech Techn. Publ., Nicholasville, KY, USA. p. 179-192.
- Vanderlei, L.C.M.; Arruda Veiga, M.C.F.; Reis, N.S.; Tambeli, C.H. 1995. Alterações histológicas de glândulas submandibulares e testículos induzidas por dietas à base de soja e dieta zinco deficiente em ratos. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 45: 193-197.
- Vasák, M. 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19: 13-17.
- Verstraeten, S.V.; Zago, M.P.; Mackenzie, G.G.; Keen, C.L.; Oteiza, P.I. 2004. Influence of zinc deficiency on cell-membrane fluidity in Jurkat, 3T3 and IMR-32 cells. *Biochem. J.* 378: 579-587.
- Voelker, H.H.; Jorgensen, N.E.; Mohanty, G.P.; Owens, M.J. 1969. Effects of zinc supplementation to dairy cattle rations. *J. Dairy Sci.* 52: 929-930 (Abs.).
- Wada, L.; Turnlund, J.R.; King, J.C. 1985. Zinc utilization in young men fed adequate and low zinc intakes. *J. Nutr.* 115: 1345-1354.
- Walsh, C.T.; Sandstead, H.H.; Prasad, A.S.; Newberne, P.M.; Fraker, P.J. 1994. Zinc: Health effects and research priorities for the 1990s. *Environ. Health Perspect.* 102 (suppl. 2): 5-46.
- Wang, F.; Dufner-Beattie, J.; Kim, B.-E.; Petris, M.J.; Andrews, G.; Eide, D.J. 2004. Zinc-stimulated endocytosis controls activity of the mouse ZIP1 and ZIP zinc uptake transporters. *J. Biochem.* 279: 24621-24639.
- Wang, K.; Zhou, B.; Kuo, Y.M.; Zenansky, J.; Gitscher, J. 2002a. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am. J. Hum. Genet.* 7: 66-73.
- Wang, X.; Fosmire, G.J.; Gay, C.V.; Leach, R.M. Jr. 2002b. Short-term zinc deficiency inhibits chondrocyte proliferation and induces cell apoptosis in the epiphyseal growth plate of young chickens. *J. Nutr.* 132: 665-673.
- Wang, X.; Zhou, B. 2010. Dietary zinc absorption: a play of Zips and ZnTs in the gut. *IUBMB Life* 62: 176-182.

- Wapnir, R.A.; Khani, D.E.; Bayne, M.A.; Lifshitz, F. 1983. Absorption of zinc by the rat ileum: effects of histidine and other low-molecular-weight ligands. *J. Nutr.* 113: 1346-1354.
- Waring, P.; Egan, M.; Braithwaite, A.; Mullbacher, A.; Sjaarda, A. 1990. Apoptosis induced in macrophages and T blasts by the mycotoxin sporidesmin and protection by Zn²⁺ salts. *Int. J. Immunopharmac.* 12: 445-457.
- Wedekind, K.J.; Baker, D.H. 1990. Zinc availability in feed-grade sources of zinc. *J. Anim. Sci.* 68: 684-689.
- Wedekind, K.J.; Hortin, A.E.; Baker, D.H. 1992. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. *J. Anim. Sci.* 70: 178-187.
- Wedekind, K.J.; Lewis, A.J.; Gieseeman, M.A.; Miller, P.S. 1994. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn-soybean meal diets. *J. Anim. Sci.* 72: 2681-2689.
- Wegner, T.N.; Ray, D.E.; Lox, C.D.; Stott, G.H. 1973. Effect of stress on serum zinc and plasma corticoids in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 56: 748-752.
- Weigand, E.; Kirchgessner, M. 1978a. Homeostatic adaptation of Zn absorption and endogenous Zn excretion over a wide range of dietary supply. In: Trace element in man and animals - 3. M. Kirchgessner, Ed. ATW Freising-Weihestephan, Germany. p. 106-109.
- Weigand, E.; Kirchgessner, M. 1976. Radioisotope dilution technique for determination of zinc absorption in vivo. *Nutr. Metab.* 20: 307-313.
- Weigand, E.; Kirchgessner, M. 1978b. Homeostatic adjustments in zinc digestion to widely varying dietary zinc intake. *Nutr. Metab.* 22: 101-112.
- Weigand, E.; Kirchgessner, M. 1980. Total true efficiency of zinc utilization determination and homeostatic dependence upon the zinc supply status in young rats. *J. Nutr.* 110: 469-480.
- Weiss, J. 1996. Trace elements in dairy cattle feeding. *Milchpraxis* 34: 101-103.
- Wessels, H.R.; Brown, K.H. 2012. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PLoS ONE* 7: e50568 (11 p.).
- Whanger, P.D.; Oh, S-H.; Deagen, J.T. 1981. Ovine and bovine metallothioneins: accumulation and depletion of zinc in various tissues. *J. Nutr.* 111: 1196-1206.
- Whittaker, P. 1998. Iron and zinc interactions in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (suppl.): 442S-446S.
- Whitaker, D.A.; Eayres, H.F.; Aitchison, K.; Kelly, J.M. 1997. No effect of a dietary zinc proteinate on clinical mastitis, infection rate, recovery rate and somatic cell count in dairy cows. *Vet. J.* 153: 197-204.
- White, C.L. 1992. Zinc deficiency in man and animals: endemic or imaginary? *Proc. Nutr. Soc. Aust.* 17: 115-124.
- White, C.L.; Martin, G.B.; Hynd, P.I.; Chapman, R.E. 1994. The effect of zinc deficiency on wool growth and skin and wool follicle histology of male Merino lambs. *Br. J. Nutr.* 71: 425-435.
- Whitenack, D.L.; Whitehair, C.K.; Miller, E.R. 1978. Influence of enteric infection on zinc utilization and clinical signs and lesions of zinc deficiency in young swine. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1447-1454.
- Wien, E.M.; Glahn, R.P.; Van Campen, D.R. 1994. Ferrous iron uptake by rat duodenal brush border membrane vesicles: Effects of dietary iron level and competing minerals (Zn⁺², Mn⁺², and Ca⁺²). *J. Nutr. Biochem.* 5: 571-577.

- Wieringa, F.T.; Dijkhuizen, M.A.; Fiorentino, M.; Lailou, A.; Berger, J. 2015. Determination of zinc status in humans: Which indicator should we use? *Nutrients* 7: 3252-3263.
- Williams, P.J.; Taylor, T.G. 1985. A comparative study of phytate hydrolysis in the gastrointestinal tract of the golden hamster. *Br. J. Nutr.* 54: 429-435.
- Williams, R.J.P. 1984. Zinc: what is its role in biology? *Endeavour* 8: 65-70.
- Williams, R.J.P. 1989. An introduction to the biochemistry of zinc. In: *Zinc in human biology*. C.F. Mills, Ed. Springer-Verlag. London. p. 15-31.
- Williamson, P.S.; Browning, J.D.; Sullivan, M.J.; O'Dell, B.L.; McDonalds, R.S. 2002. Neuropeptide Y fails to normalize food intake in zinc-deficient rats. *Nutr. Neurosci.* 5: 19-25.
- Wood, R.J.; Zheng, J.J. 1997. High dietary calcium intakes reduces zinc absorption and balance in humans. *Am. J. Cl. Nutr.* 65: 1803-1809.
- Wright, C.L. 2000. Evaluation of absorption and post-absorptive metabolism of inorganic and organic zinc sources. Ph.D. dissertation. North Carolina State University, Raleigh, USA. 164 p.
- Wright, C.L.; Spears, J.W. 2004. Effect of zinc source and dietary level on zinc metabolism in Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 87: 1085-1091.
- Wright, C.L.; Spears, J.W.; Web, K.E., Jr. 2008. Uptake of zinc from zinc sulfate and zinc proteinate by ovine ruminal and omasal epithelia. *J. Anim. Sci.* 86: 1357-1363.
- Wu, F.Y.-H.; Wu, C.-W. 1983. The role of zinc in DNA and RNA polymerases. In: *Zinc and its role in biology and nutrition (Metal ions in biological systems, vol. 15)*. H. Sigel and A. Sigel, Eds. Marcel Dekker. New York. p. 157-192
- Wyllie, A.H. 1997. Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull.* 53: 451-465.
- Xia, J.; Browning, J.D.; O'Dell, B.L. 1999. Decreased plasma membrane thiol concentration associated with increased fragility of erythrocytes in zinc-deficient rats. *J. Nutr.* 129: 814-819.
- Xia, J.; O'Dell, B.L. 1995. Zinc deficiency in rats decreases thrombin-stimulated platelet aggregation by lowering protein kinase C activity secondary to impaired calcium uptake. *J. Nutr. Biochem.* 6: 661-666.
- Yamaji S.; Tennant, J.; Tandy, S.; Williams, M.; Srai, S.K.S.; Sharp, P. 2001. Zinc regulates the function and expression of the iron transporters DMT1 and IREG1 in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 507: 137-141.
- Yang, Y.; Maret, W.; Vallee, B.L. 2001. Differential fluorescence labelling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 5556-5559.
- Yanke, L.J.; Bae, H.D.; Selinger, L.B.; Cheng, K.-J. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* 144: 1565-1573.
- Yi, Z.; Kornegay, E.T.; Denbow, D.M. 1996. Supplemental microbial phytase improves zinc utilization in broilers. *Poultry Sci.* 75: 540-546.
- Yu, Y.Y.; Kischke, C.P.; Huang, L. 2006. Immunohistochemical analysis of ZnT1, 4, 5, 6 and 7 in the mouse gastrointestinal tract. *J. Histochem. Cytochem* 55: 223-234.
- Zalewski, P.D.; Forbes, I.J.; Betts, W.H. 1993. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn, using Zinquin, a new specific fluorescent probe for zinc. *Biochem J.* 296: 403-408.
- Zhang, B.; Guo, Y. 2007. Beneficial effects of tetrabasic zinc chloride for weanling piglets and the bioavailability of zinc in tetrabasic form relative to ZnO. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135: 75-85.

- Zhou, J.R.; Canar, M.M.; Erdman, J.W., Jr. 1993. Bone zinc is poorly released in young, growing rats fed marginally zinc-restricted diet. *J. Nutr.* 123: 1383-1388.
- Zhou, J.R.; Erdman, J.W., Jr. 1995. Phytic acid in health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 495-508.
- Zhou, J.R.; Wong, M.S.; Burns, R.A.; Erdman, J.W. 1992. Phytic acid reduction in soy protein improves zinc bioavailability. *J. Nutr.* 122: 2466-2473.
- Zubay, G.L. 1998. *Biochemistry*. Fourth Edition. WCP Publishers. Dubuque, IA, USA.