Proyecto de investigación

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

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Pampa

1.1. Título del Proyecto: Comparación de una fuente inorgánica y una fuente orgánica de zinc en ovinos.

1.2. Tipo de investigación: aplicada.

1.3. Campo de aplicación principal: 1299 (Otros: Nutrición Animal).

2.1. Cátedras: Nutrición Animal, Producción Porcina, Patología General y Anatomía Patológica.

2.2. Áreas y/o Institutos: Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa.

2.3. Otras instituciones: INTA Balcarce, INTA Mercedes (Bs. As.).

2.4. Integrantes del equipo:

Apellido y Nombre	Función	Cátedra o Institución	Tiempo de dedicación
Pechin, Guillermo H.	Director	Depto. de Prod. Animal	50 %
Cseh, Susana B.	Integrante	INTA Balcarce	20 %
Corbellini, Carlos N.	Consultor	INTA Mercedes (Bs. As.)	20 %
Álvarez, Ángela R.	Integrante	Patología	50 %
Galeano, María Fernanda	Integrante	Patología	50 %
Denda, Silvina S.	Integrante	Nutrición Animal	50 %
Ginart, Luciano	Integrante	Nutrición Animal	50 %
Beltramo, Analia Anahí	Integrante	Nutrición Animal	50 %

3.1. Duración estimada del proyecto: 30 meses.

3.2. Fecha de iniciación: 1 de enero de 2009.
Fecha de finalización: 31 de diciembre de 2011.

4.1. Resumen del proyecto:

El objetivo del trabajo es estimar la biodisponibilidad relativa (BDR) del zinc (Zn) en un complejo aminoácidos-zinc con respecto al sulfato de zinc monohidratado ($ZnSO_4.H_2O$) para ovinos en crecimiento. Veinte corderos de raza Corriedale, con un peso aproximado de 10 kg, serán asignados en forma aleatoria, estratificando por peso inicial, a cinco grupos: Deficiente (D), suplementados con $ZnSO_4.H_2O$ y suplementados con Availa-Zn 100 (Zinpro Corporation, USA), en ambas fuentes para proveer niveles adicionales de 10 y 20 ppm (S10, S20, A10 y A20). La dieta basal se formulará a base de paja de trigo, almidón de maíz, albúmina de huevo deshidratada, aceite de girasol, urea, bicarbonato de sodio y núcleo mineral-vitamínico, y proveerá 10 ppm de Zn, base materia seca (MS). Los corderos serán alojados en jaulas de plástico, de 1 m x 0,5 m, con piso ranurado. Al inicio del trabajo los corderos serán esquilados en un rectángulo de 8 x 10 cm en el flanco. El ensayo se extenderá

por el término de 5 meses, período durante el cual los animales se pesarán mensualmente. También mensualmente, serán sangrados de vena yugular, para la posterior medición de parámetros hematológicos y de los niveles plasmáticos de Zn y cobre (Cu) por Espectrofotometría de Absorción Atómica, y de fosfatasa alcalina (FA) por un método colorimétrico cinético. A los 45 días y hacia el final del período experimental, se realizarán ensayos de balance de Zn, Cu y nitrógeno (N). Al finalizar el trabajo, se medirá la producción de lana del área esquilada. Los corderos serán faenados y se tomarán las muestras correspondientes para la determinación de los niveles de Zn y Cu en lana, hueso (metacarpo y metatarso), músculo (longissimus dorsi, supraescapular y semimembranoso), hígado, páncreas y riñón. En testículo, páncreas, piel y en epitelios de lengua, esófago, vejiga y rumen se realizará un estudio histológico. En hueso se realizará morfometría e histomorfometría. Los datos serán analizados con un ANOVA y una prueba de Tukey para comparación de medias. Posteriormente se proseguirá siguiendo los lineamientos de un ensayo de "relación de pendientes" para la estimación de la BDR.

5.1. Introducción

a) Deficiencia de zinc en rumiantes

Las pruebas inequívocas de que el zinc (Zn) es un nutriente esencial para los animales fue obtenida, por primera vez, por Todd et al. (1933), trabajando con 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.

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., 1965). 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 descripta 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).

Los signos clínicos de la deficiencia de Zn 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, anormalidades esqueléticas, dificultosa reparación de heridas, etc. (Underwood y Suttle, 1999; Mills, 1978).

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-gliceralcehído 3-fostafo deshidrogenasa, alfa-manosidasa, alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina (FA), carboxipeptidasa, aminolevulínico deshidratasa, retineno reductasa, ADN y ARN polimerasas, timidina quinasa, Cu-Zn superóxido dismutasa (Miller, 1970; Underwood y Suttle, 1999; Smart y Cymbaluk, 1991; Miller et al., 1993). También desempeña otras funciones esenciales, como estabilizar los grupos sulfhidrilos de las proteínas de membrana, formar parte de factores de transcripción y de receptores de hormonas estrogénicas, etc. (Underwood y Suttle, 1999). 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 regulación de la transcripción génica, la reproducción, el funcionamiento del sistema inmunológico, la síntesis y el transporte de la vitamina A, el control de los radicales libres, etc.

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 descripto 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). La pérdida del sabor descripta en humanos podría deberse a la oclusión de las papilas gustativas con queratina, lo que sí ha sido descripto en ovejas deficientes en Zn (Mills, 1978).

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 y Suttle, 1999). Sommers y Underwood (1969) hallaron una mayor excreción urinaria de nitrógeno (N) en los corderos deficientes en comparación con los controles pareados por consumo, lo que indica una falla en el metabolismo de la proteína. Similares resultados en crecimiento y conversión alimenticia son citados por Miller et al. (1968) en lechones.

Una deficiencia subclínica de zinc, 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. 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 para bovinos de carne fueron fijados en 30 ppm por el National Research Council (NRC, 1996), entre 40 y 63 ppm, de acuerdo al nivel de producción, para vacas lecheras (NRC, 2001) y entre 20 y 33 ppm para ovinos y caprinos (NRC, 2007).

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) reportaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) 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 descrito efectos positivos de la suplementación con Zn en casos de deficiencias subclínicas. 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.

Las enfermedades podales en bovinos de carne y de leche responden a múltiples factores: climáticos, de manejo, infecciosos, dietarios (Acuña, 2004). 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 $ZnSO_4$ 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.

Recientemente, 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.

Coincidiendo parcialmente con estos resultados, Kincaid et al. (1984) habían encontrado respuestas en producción de leche y conteo de células somáticas tanto con ZnO como con metionina-Zn. 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. Hay consenso, en la actualidad, en torno a que, en la mayoría de los casos, resulta positiva la suplementación con Zn en vacas de alta producción.

En la experiencia de nuestro grupo de investigación, y a través de trabajos de campo realizados en las provincias de La Pampa y Buenos Aires, la suplementación con ZnO oral o metionina-Zn inyectable disminuyó sustancialmente la incidencia de afecciones podales, en algunos establecimientos, tanto en bovinos para carne como en bovinos lecheros. Las afecciones podales que se presentaron fueron caracterizadas como dermatitis interdigital, según la clasificación moderna (Greenough y Weaver, 1997). Sin embargo, en un ensayo realizado posteriormente (Pechin et al., 2001a), no pudo demostrarse un efecto beneficioso significativo sobre la incidencia de enfermedades podales ni sobre ganancia de peso. Por otro lado, también se verificaron variaciones de magnitud entre años en la composición mineral de los verdeos y pasturas. El uso preventivo de pediluvios en este mismo establecimiento de invernada tuvo excelentes efectos preventivos sobe la incidencia de dermatitis interdigital (Pechin et al., 2001b).

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 $ZnSO_4$ 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.

La concentración de Zn en suero o plasma es el indicador de deficiencia más ampliamente usado, pero su certeza y sensibilidad no es demasiado buena 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 espurios. McDowell (1992) sostiene 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, pero que estas mediciones deberían combinarse con la determinación del Zn en forrajes, en el caso de estudios de relevamiento.

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., 1965b; 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 ± 23,61 ppm.

De manera coincidente, Underwood y Suttle (1999) señalan 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., 1965a).

b) Biodisponibilidad del Zn en los alimentos

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 condicen 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 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).

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 donde la principal vía de excreción es la gastrointestinal.

La absorción verdadera o digestibilidad verdadera no considera 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:

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

El valor 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 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. Wedekind et al. (1994), trabajando en 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. 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 de metalotioneína aparece como un indicador promisorio del status de Zn en ratas (Sato et al., 1984). Rojas et al. (1995) hallaron que la concentración de metalotioneína 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 descripto 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.

En monogástricos, la absorción del Zn parece tener lugar principalmente en el intestino delgado (McDowell, 1992), al igual que en rumiantes (Miller y Cragle, 1965), aunque existen evidencias en ovinos acerca de que la absorción del Zn en el rumen pueden ser aún mayor que en intestino delgado (Arora et al., 1969).

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 (Cousins, 1985). Varios investigadores hallaron que el transporte de Zn tiene un componente saturable y otro no saturable (Menard y Cousins, 1983; Hoadley et al., 1987; Tacnet et al., 1990). Los procesos saturables ocurren a través de un mecanismo de difusión facilitada (mediado por transportadores), que puede ser secundariamente activo (Cousins et al., 2006). 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).

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), potenciando la acción de los fitatos (Morris y Ellis, 1980; Zhou y Erdman, 1995), cadmio (Cd) (McDowell, 1992), cobre (Cu) (Van Campen, 1969), hierro (Kreuzer y Kirchgessner, 1994), fibra dietaria (Kelsay et al.,

1979), baja proteína dietaria (Van Campen y House, 1974) y status previo de Zn (Evans et al., 1975; Flanagan et al., 1983). En monogástricos, con el uso de dietas comúnmente usadas en la práctica, la relación (fitatos x Ca)/Zn predice mejor la biodisponibilidad del Zn que la simple relación fitato/Zn (Fordyce et al., 1987).

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 EDTA (Forbes, 1961) y el ácido ascórbico (Solomons et al., 1979), incrementan la absorción de Zn.

En rumiantes, es muy escasa la información acerca de los factores que afectan la absorción o utilización del Zn. 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. Existen algunos informes que señalan que altos consumos de Ca pueden incrementar los requerimientos de Zn en vacas lecheras (Haaranen, 1963). Sin embargo, en otros trabajos en animales con rumen funcional los efectos de altas concentraciones de Ca dietario fueron pequeños (Fontenot et al., 1965; Mills y Dalgarno, 1967) o nulos (Miller et al., 1963; Kincaid, 1979). A luz de estos resultados, y coincidiendo con Mills (1978), resulta improbable que el Ca pueda tener importancia cuando se utilizan dietas naturales. Al igual que en monogástricos, existen informes de que el Cd es un competidor del Zn en rumiantes (Powell et al., 1967). El factor dietario más importante que regula la absorción del Zn es el contenido de Zn de la dieta. A medida que el Zn dietario se incrementa, el porcentaje absorbido disminuye, y viceversa. El status previo de Zn del animal también influye notablemente, ya que animales deficientes tienen un absorción neta mucho mayor (Miller, 1970).

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 hasta ese momento, 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) y cerdos (Hahn y Baker, 1993; Wedekind et al., 1994) surge que el $ZnSO_4.H_2O$ o el $ZnSO_4.7H_2O$, usados normalmente como estándares, son superiores al ZnO.

En rumiantes (bovinos y ovinos) la tendencia general parece ser: $ZnSO_4$ > ZnO > $ZnCO_3$ > ZnCl (Baker y Ammerman, 1995), aunque la superioridad del sulfato sobre el óxido de Zn no ha sido fehacientemente demostrada (Miller et al., 1970; Kincaid, 1979).

Hace relativamente poco tiempo, la industria comenzó a producir complejos orgánicos de distintos minerales, de los cuales los más utilizados son los proteinatos y aminoatos. Se ha sostenido que su impacto en nutrición animal se debe a 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 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. Heinrich 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 Zerigue, 1994).

Brown y Zerigue (1994) midieron la solubilidad de distintos proteinatos 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 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. De todas maneras, para extraer conclusiones más ajustadas, 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 bajo variadas condiciones en producción animal.

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).

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 desempeño productivo y Zn plasmático. La metionina-Zn tuvo una biodisponibilidad superior al ZnO, aunque inferior al $ZnSO_4$, tomando como criterios Zn en plasma y hueso (Wedekind et al., 1994). Hahn y Baker (1993) encontraron que metionina-Zn y $ZnSO_4$ sostuvieron niveles de Zn plasmático superiores al ZnO.

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 $ZnSO_4$ 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 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 recientemente 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. 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. Se investigaron también los efectos de la cantidad y fuente de Zn sobre la respuesta inmune en terneros. Los mismos consumían una dieta que contenía 26,4 ppm de Zn y fueron suplementados con 25 ppm de Zn adicionales a partir de ZnO y metionina-Zn. Los animales suplementados con metionina-Zn mostraron mayores títulos de anticuerpos cuando fueron inmunizados contra el herpes virus bovino, mientras que los suplementados con ZnO mostraron títulos intermedios (Spears et al., 1991). 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 biodisponiblidad. 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) sumariza 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. 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.

Los complejos Zn-aminoácidos se presentan como una alternativa en la elección de compuestos orgánicos de Zn, para alimentación animal. Cuando un complejo Zn-aminoácidos (Availa Zn, Zinpro Corportation, USA) fue comparado con metionina-Zn, los parámetros medidos en feedlot (ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia) 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 disminuyó la incidencia de enfermedades podales (úlcera solar y dermatitis interdigital) en vacas lecheras.

En un ensayo realizado en ovejas, Hatfield et al. (2001) hallaron pequeñas ventajas en los niveles de Zn hepático como resultado de la alimentación con un complejo Zn-aminoácidos en lugar de sulfato de Zn, pero no observaron diferencias en la concentración de FA sérica. Cao et al. (2000) compararon la BDR del Zn en varias fuentes orgánicas en relación al sulfato de Zn 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 sulfato de zinc y Zn-aminoácidos en pollos parrilleros, pero Burrell et al. (2004) hallaron que la excreción acumulativa de Zn por heces era menor con Zn-aminoácidos que con sulfato de Zn.

Swinkels et al. (1996) no hallaron diferencias entre sulfato de Zn 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 sulfato de Zn y Zn-aminoácidos en la alimentación de cerdas y lechones destetados. Los parámetros de acumulación tisular fueron similares en ambas fuentes, tanto en madres como en lechones, pero el número de lechones nacidos y destetados fue superior en las cerdas alimentadas con Zn-aminoácidos.

c) Ensayos de biodisponibilidad

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, 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 testeado en la dieta basal, más sensitivo será el ensayo para medir la biodisponibilidad. En los estudios en los que se miden respuestas a concentraciones dietarias por encima del requerimiento, la concentración del elemento en la dieta base es relativamente menos importante (Ammerman, 1995).

Otra consideración es que los animales mantienen la homeostasis secretando parte del Zn corporal en exceso en el lumen intestinal. Para prevenir que este mecanismo ocurra, los animales deberían sufrir un período de depleción de Zn antes de comenzar el ensayo, si éste es de corta duración (Swinkels et al., 1994).

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, se debería realizar un experimento 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, metalotioneína 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).

Panemangalore y Bebe (1997) han comentado, en un excelente trabajo, 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 hace 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. La fuente de fibra plantea algún problema, también, ya que las fuentes de celulosa lignificada pueden poseer Zn y Cu. La fibra o cáscara de algodón tratadas con sulfito pueden ser una buena opción (Mills, 1978).

En el Cuadro 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.

Cuadro 1. Dietas semisintéticas 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 mineral-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] Underwoods y Somers, 1969 [e] Ott et al., 1964.

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 col. (1995), siguiendo las recomendaciones generales de Finney (1978), y son brevemente expuestos a continuación.

La mayoría de los ensayos de biodisponibilidad usan métodos de regresión. La variable independiente (*y*) 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 (*x*), 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 (*y*) y dependiente (*x*) 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".

Algunos ensayos no producen una relación lineal entre *x* e *y*, pero se puede recurrir a un modelo de "ensayo de líneas paralelas", recurriendo a la transformación logarítmica de la variable *x*. El valor de BDR es estimado como BDR = antilog $[(a_t - a_s)/b]$.

De los ensayos realizados, hasta el momento, para estimar la BDR de las distintas fuentes de Zn en rumiantes (bovinos y ovinos), ninguno ha utilizado el método de relación de pendientes. Este método se considera mucho más apropiado para medir la BDR en un rango de concentraciones de *x*. Si se toma un valor o concentración de *x* (Zn en la dieta) en un ensayo y otro valor de *x* en otro, los valores de BDR hallados serán distintos y no completamente comparables. Esta situación es la planteada cuando se comparan los distintos resultados obtenidos en rumiantes por Spears (1989), Kegley y Spears (1994) y Rojas et al. (1995).

A raíz de la información controvertida analizada en esta revisión, surge la necesidad de profundizar en los trabajos de evaluación de la BDR del Zn en las distintas fuentes minerales, especialmente en rumiantes. Si bien la extrapolación entre especies puede llevar a resultados no totalmente exactos, el modelo ovino puede considerarse una aproximación adecuada al modelo rumiante para los ensayos de BDR.

5.2. <u>Resultados alcanzados por el/los autores dentro del área del conocimiento del proyecto:</u>

- Estudio de las deficiencias minerales en bovinos de carne en el departamento Maracó, provincia de La Pampa, Argentina. Pechin, G.H.; Cseh, S.; Corbellini, C.N.; Idiart, J.L.; Moralejo, R.; Visconti, M.; Drake, M.; Yarrar, M. Revista Argentina de Producción Animal 15 (2): 492-494. 1995.
- Efectos de la suplementación con óxido de zinc o metionina-zinc en vacas lecheras marginalmente deficientes. Corbellini, C.N. y col. Revista de Medicina Veterinaria 78 (6): 439-447. 1997.
- El zinc en la nutrición de los rumiantes (Revisión bibliográfica). Pechin, G.H. Ciencia Veterinaria 1: 50-79. 1999.

- Efecto de la suplementación con óxido de zinc en bovinos para carne alimentados con forrajes marginalmente deficientes en zinc. Pechin, G.H.; Corbellini, C.N.; Cseh, S.B.; Meglia, G.E.; Vergara, L.A.; Tossoni, R.A.; Moralejo, R.H. Revista de Medicina Veterinaria. 82 (6): 308-311. 2001.
- Deficiencia experimental de zinc en ovinos. 1. Efectos sobre el crecimiento, la producción de lana y parámetros bioquímicos. Pechin, G.H.; Corbellini, C.N.; Cseh, S.B.; Álvarez, A.R.; Mángano, V. 29° Congreso Argentino de Producción Animal, Mar del Plata, 18 al 20 de octubre de 2006. Revista Argentina de Producción Animal 26 (Supl. 1): 44-45.
- Deficiencia experimental de zinc en ovinos. 2. Efecto sobre la concentración tisular de zinc y cobre. Pechin, G.H.; Corbellini, C.N.; Cseh, S. B. 31° Congreso Argentino de Producción Animal, Potrero de los Funes, 15 al 17 de octubre de 2008. Revista Argentina de Producción Animal 28 (Supl. 1): 84-85.

6.1. Hipótesis, objetivos y resultados esperados:

Hipótesis:

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

Objetivos:

Estimar la biodisponibilidad relativa del Zn en el complejo Zn-aminoácidos (Availa Zinc 10, Zinpro Corporation, USA) con respecto al $ZnSO_4.H_20$ para ovinos en crecimiento.

Resultados esperados:

Los resultados y conclusiones del presente ensayo permitirán:
a) Una mejor definición de los parámetros para el diagnóstico de la deficiencia subclínica de Zn.
b) Mejorar el conocimiento del metabolismo del Zn en ovinos.
c) La elección de la fuente más eficiente y de menor costo para la suplementación con Zn en ovinos.
d) Comprobar una metodología extrapolable al estudio de otras deficiencias minerales.

6.2. Materiales y Métodos:

Veinte corderos de raza Corriedale, con un peso aproximado de 10 kg serán asignados en forma aleatoria, estratificando por peso inicial, a cinco grupos: Deficiente (D), suplementados con $ZnSO_4.H_2O$ 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, quedarán conformados grupos de 4 corderos cada uno, para realizar un ensayo de biodisponibilidad relativa. Todos los animales recibirán una dieta a base de paja de trigo, almidón de maíz, sacarosa, albúmina de huevo deshidratada, aceite de girasol, urea, bicarbonato de sodio y núcleo mineral-vitamínico. Esta dieta es similar a la utilizada en su ensayo por White et al. (1994), con algunas modificaciones: se disminuye el contenido de paja

de trigo, se incrementa el de albúmina de huevo y se suplanta el aceite de soja por el de girasol.

Tabla 1. 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 2. 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 $CaHPO_4.2H_2O$ - $Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$	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 ($CuSO_4.H_2O$)	23 mg
sulfato de cobalto ($Co\ SO_4$)	0,8 mg
iodato de calcio ($Ca(IO_3)_2.H_2O$)	0,33 mg
selenito de sodio (al 1 %) (Na_2SeO_3)	44 mg
sulfato ferroso ($FeSO_4.H_2O$)	156 mg
vitamina A	5.000 UI
vitamina D_3	1.000 UI
vitamina E	50 UI

Dicha dieta será preparada en el laboratorio, y se transportará hasta el galpón en recipientes plásticos tapados. El mezclado de la dieta se facilitará 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 administrará dos veces al día, por la mañana y por la tarde. Los corderos serán alojados en jaulas de plástico, de 1 m x 0,5 m, con piso ranurado. Se procederá con un período de destete y acostumbramiento de dos semanas, durante las cuales los animales serán alimentados con gramíneas, cortadas y ofrecidas en estado fresco. El ensayo durará 5 meses. Debido a que se cuentan con 10 jaulas metabólicas, se realizarán dos tandas sucesivas de 10 corderos cada una. Al inicio del ensayo, se esquilará un área de 80 cm^2, del flanco de cada cordero, con el objeto de medir el crecimiento y la calidad de la lana en ambos grupos. Los

animales se pesarán mensualmente, para evaluar la evolución de la ganancia de peso. También mensualmente, serán sangrados de vena yugular y se extrerán dos submuestras de sangre de cada animal, con diferentes anticoagulantes. Las submuestras extraídas con heparina serán centrifugadas a 2.000 rpm, para la posterior medición en plasma de los niveles de Zn y Cu por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA; Piper y Higging, 1967) y de FA, de acuerdo al método colorimétrico cinético (Castilla et al., 1990). Las submuestras de sangre obtenidas con EDTA sódico como anticoagulante se utilizarán para realizar un hemograma completo. A los 45 días y durante la última semana del trabajo se realizarán sendos ensayos de balance de Zn, de Cu y de N. Durante el período de balance (5 días) se medirá el alimento consumido por cada animal y la producción de heces y de orina, las que se recogerán diariamente. Se tomará una alícuota diaria de cada excreta (30 gr para heces y 20 ml para orina), y se guardarán a - 20 ºC hasta su análisis. A partir de estos datos, se calculará la cantidad de Zn, Cu y N digeridos (digestibilidad aparente) y retenidos diariamente por cada animal. Los análisis de N en alimento, heces y orina se realizarán por el método de Kjeldhall (AOAC, 1990).

Al finalizar el ensayo, se cortará la lana de las áreas previamente delimitadas. Las muestras se pesarán para medir la producción de lana. Una submuestra será enviada al laboratorio para la medición de las concentraciones de Zn y Cu por EAA. Se procederá al sacrificio de los animales por exanguinación. Luego del mismo, se recogerán 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 tomarán muestras de piel, testículo, páncreas y del epitelio de lengua, 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) serán 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 realizará la tinción con hematoxilina-eosina. En huesos metacarpiano y metatarsiano se realizará morfometría (peso sin médula ósea, largo, diámetro total, espesor cortical e índice cortical) e histomorfometría (ancho de cartílago de crecimiento, de espongiosas primaria y secundaria, porcentaje de áreas cubiertas de hueso). También se determinará el porcentaje de cenizas luego del desgrasado del hueso con éter.

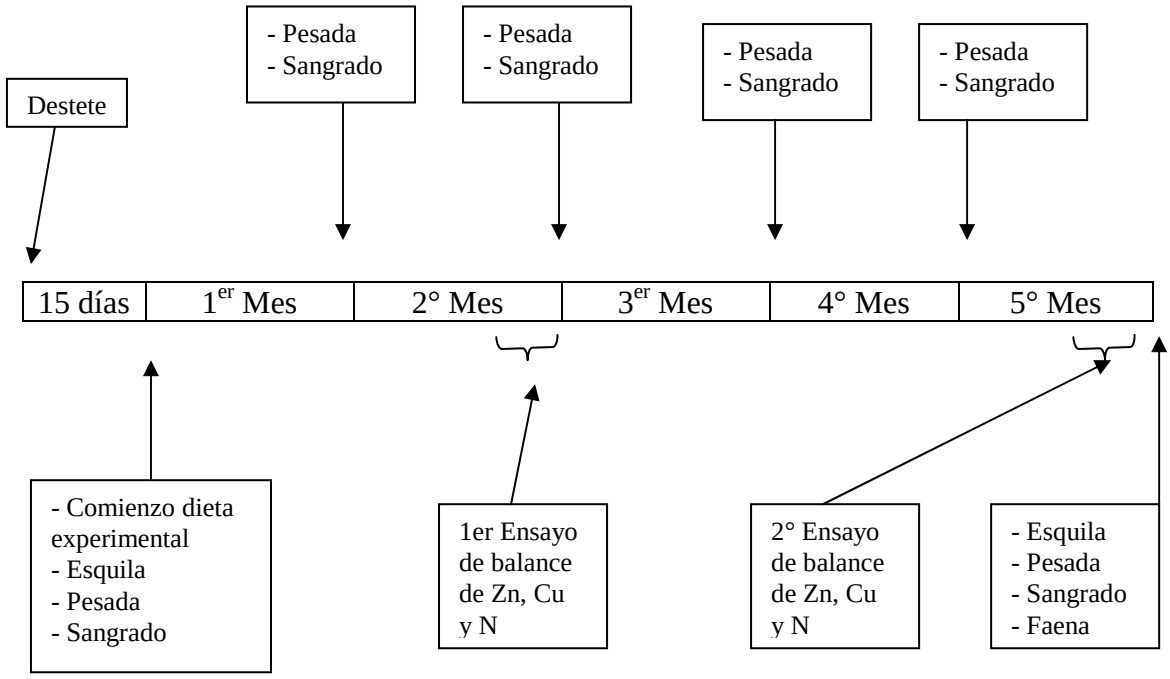
Diseño experimental y análisis estadístico: El análisis de los parámetros ganancia de peso, producción de lana, Zn y Cu en plasma y tejidos, FA en plasma, variables hematológicas, indicadores de morfometría e histomorfometría, y los valores de retención neta de Zn, Cu y N, seguirá los lineamientos de un ensayo de "relación de pendientes" (Littell et al., 1995). Los parámetros mencionados serán las variables dependientes y el nivel de Zn suplementario, la variable independiente. Los resultados se analizarán a través de un análisis de varianza. El mismo permitirá comprobar los dos criterios de validez estadística del modelo, según Finney (1978): la linealidad de las regresiones y la intersección de las líneas de regresión al nivel cero de suplementación. Además, permitirá comparar las pendientes y obtener los valores de BDR para el complejo Zn-aminóacidos en relación al $ZnSO_4.H_2O$ como se mencionara en la Introducción:

BDR para Zn-AA = $b_o/b_s \; x \; 100$

donde b_o y b_s son las pendientes de las regresiones para ZnAA y $ZnSO_4.H_2O$.

Dicho análisis permitirá comparar, también, los distintos parámetros elegidos de acuerdo a su R^2 (Suma de Cuadrados de la Regresión/Suma de Cuadrados Total).

Esquema general de trabajo con cada tanda de corderos:



6.3. <u>Cronograma anual de actividades:</u>

	Mes (Año 2009)											
Actividad	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Revisión bibliográfica y puesta a punto de procedimientos	x	x	x	x	x	x	x	x				
Ensayo de campo									x	x	x	x

	Mes (Año 2010)											
Actividad	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Ensayo de campo	x	x							x	x	x	x
Trabajo de laboratorio (minerales, histopatología).			x	x	x	x	x	x				

	Mes (Año 2011)											
Actividad	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Ensayo de campo	x	x										
Trabajo de laboratorio (minerales, histopatología).			x	x	x	x	x	x				
Redacción de informe									x	x	x	x

6.4. <u>Formación de recursos humanos:</u>

Se prevé realizar Seminarios internos en el grupo de investigación, coordinados por el director en torno al tema de Deficiencias Minerales en Animales Domésticos, y específicamente sobre Deficiencia de Zinc. Se revisará información acerca del nuevo encuadre conceptual propuesto por el Dr. N.F. Suttle en la tercera edición de su libro "The mineral nutrition of livestock", en relación con los eventos fisiopatológicos de la deficiencia de zinc y la interpretación de distintas herramientas diagnósticas. Se discutirán los nuevos métodos de cálculo de requerimientos minerales presentados por el National Research Council en la séptima edición de "Nutrient Requirements of Dairy Cattle (2001)" y en la nueva edición de ¨Nutrient Requirements of Small Ruminants (2007)".

En dichos Seminarios se analizarán también trabajos de investigación relacionados con el tema del trabajo y aspectos relacionados con metodología de la investigación y escritura científica.

Se continuará con la realización de los Seminarios de Nutrición Animal, aprobados por Resolución N° 034/2009 del Consejo Directivo de la Fac. de Cs. Veterinarias, UNLPam.

Los integrantes del equipo realizarán prácticas con programas de computación específicos para la carga y análisis estadístico de los datos: Planilla de cálculos Excel, Statistix 3.1 y SAS.

Los adscriptos a la cátedra de Nutrición Animal se sumarán a las tareas del proyecto de investigación y de los seminarios.

Se prevé la incorporación de becarios de iniciación a la investigación, luego de la apertura anual de la convocatoria para becas de la UNLPam.

7.1. <u>Infraestructura (ya existente):</u>

Facultad de Ciencias Veterinarias de Gral. Pico: Laboratorios de Patología y Nutrición.

INTA Balcarce: Laboratorio de Bioquímica Clínica, Área de Producción Animal.

8.1. <u>Presupuesto estimado para el proyecto:</u>

- 20 corderos x $ 100 c/u	$ 2.000.-
- 20 corderos x 150 días x 0,6 kg de alimento/día = 1.800 kg x $ 2.- c/u	$ 3.600.-
- 10 jaulas metabólicas x $ 300 c/u	$ 3.000.-
- 100 análisis de Zn en suero x $ 6 c/u	$ 600.-
- 100 análisis de fosfatasa alcalina en suero x $ 5 c/u	$ 500.-
- 40 análisis de Zn en heces x $ 9 c/u	$ 360.-
- 40 análisis de Zn en orina x $ 9 c/u	$ 360.-
- 40 análisis de N en heces x $ 7 c/u	$ 280.-
- 40 análisis de N en orina x $ 7 c/u	$ 280.-
- 20 determinaciones de Zn en tejidos x 9 tejidos x $ 9 c/u	$ 1.620.-
- 20 preparados histológicos x 9 tejidos x $ 30 c/u	$ 5.400.-
- Fotocopias y libros	$ 1.000.-
- Asistencia a 2 Congresos de AAPA, 1 persona	$ 2.000.-
- Viajes a Mercedes (Bs. As.) para trabajo con cosultor	$ 1.000.-
- Varios	$ 500.-
Total	**$ 22.500.-**

Año 2009: $ 9.000.-

Año 2010: $ 8.500.-

Año 2011: $ 5.000.-

9. <u>Bibliografía</u>:

- Acuña, R. 2004. Cojeras del bovino: Fisiopatología y profilaxis. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires.
- Ammerman, C.B.; Baker, D.H.; Lewis, A.J. 1995. Introduction. In: Bioavailability of nutrients for animals. Academic Press. San Diego. USA. p. 1-3.
- 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.
- 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.
- 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, VA, USA.
- 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.
- 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.
- Bostico, A.; Bonomi, A. 1964. Zinc content of forage. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet. 18: 268. (Nutr. Abs. Rev. 35: 1224).
- Bronner, F. 1987. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. J. Nutr. 117: 1347-1352.
- 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.
- Burrell, A.L.; Dozier, W.A. 3rd; Davis, 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. J. Poult. Sci. 45: 255-263.
- 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.
- Castilla, I.; Mingillo, L.; Siciliano, M. 1990. Fosfatasa alcalina. Un problema en el laboratorio de análisis clínico. Rev. Asoc. Bioq. Arg. 54: 47.
- Combs, D.K.; Goodrich, R.D.; Meiske, J.C. 1982. Mineral concentrations in hair as indicators of mineral status: a review. J. Anim. Sc. 54: 391-398.
- 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: 439-47.
- 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.; Liuzzi, J.P.; Lichten, L.A. 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. J. Biol. Chem. 281: 24085-24089.
- 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.
- Demertzis, P.N.; Mills, C.F. 1973. Oral zinc therapy in the control of infectious pododermatitis in young bulls. Vet. Rec. 93: 219-22.

- 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.
- Dynna, O.; Havre, G.N. 1963. Interrelationship of zinc and copper in the nutrition of cattle. Acta Vet. Scand. 4: 197-208.
- 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.
- Evans, G.W.; Grace, C.I.; Votava, H.J. 1975. A proposed mechanism for zinc absorption in the rat. Am. J. Physiol. 228: 501-505.
- Evans, G.W. ; Johnson, E.E.; Johnson, P.E. 1979. Zinc absorption in the rat determined by radioisotope dilution. J. Nutr. 109: 1258-1264.
- Fairweather-Tait, S.J. 1987. The concept of bioavailability as it relates to iron nutrition. Nutrition Res. 7: 319-325.
- Finney, D.J. 1978. Statistical method in biological assay. 3rd Ed. Griffen, London, UK.
- 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.
- 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).
- 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.
- 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.
- Franz, K.B.; Kennedy, B.M.; Fellers, D.A. 1980. Relative bioavailability of zinc using weight gain of rats. J. Nutr. 110: 2263-2271.
- Giroux, E.; Prakash, N.J. 1977. Influence of zinc-ligand mixtures on serum zinc levels in rats. J. Pharm. Sci. 66: 391-395.
- Grenough, P.R.; Weaver, A.D. 1997. Lameness in cattle. Third Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA.
- Haaranen, S. 1963. Zinc requirements of dairy cattle for removal of deficiency symptoms. Feedstuffs 35: 17-18.
- 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.
- Hatfield, P.G.; Swenson, C.K.; Kott, R.W.; Ansotegui, R.P.; Roth, N.J. ; Robinson, B.L. 2001. Zinc and copper satus in ewes supplemented with sulfate- and amino acid-complexed forms of zinc and copper. J. Anim. Sci. 79: 261-266.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.

- Kincaid, R.L. 1979. Biological availability of zinc from inorganic sources with excess dietary calcium. J. Dairy Sc. 62: 1081-1085.
- 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 Sc. 67 (suppl. 1): 103 (Abstract).
- 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.
- Legg, S.P.; Sears, L. 1960. Zinc sulphate treatment of parakeratosis in cattle. Nature 4730: 1061-1062.
- 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.
- Masters, D.G.; Fels, H.E. 1980. Effect of zinc supplementation on the reproductive performance of grazing merino ewes. Biological Trace Elem. Res. 2: 281-290.
- 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/.
- McDowell, L.R. 1992. Minerals in animal and human nutrition. Academic Press. San Diego, CA, USA.
- 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.; Baltzer, B.V.; Bradley, B.L.; Hoefer, J.A. 1968. Biochemical, skeletal and allometric changes due to zinc deficiency in the baby pig. J. Nutr. 95: 278-286.
- Miller, W.J. 1970. Zinc nutrition in cattle: a review. J. Dairy Sc. 53: 1123-1135.
- Miller, J.K.; Cragle, R.G. 1965. Gastrointestinal sites of absorption and endogenous secretion of zinc in dairy cattle. J. Dairy Sc. 48: 370-373.
- Miller, J.K.; Miller, W.J. 1960. Development of zinc deficiency in Holstein calves fed a purified diet. J. Dairy Sc. 43: 1854-1856.
- Miller, J.K.; Miller, W.J. 1962. Experimental zinc deficiency and recovery of calves. J. Nutr. 76: 467-474.
- 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 ^{65}Zn 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 Sc. 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.; Martin, Y.G.; Gentry, R.P.; Blackmon, D.M. 1968. ^{65}Zn and stable zinc absorption, excretion and tissue concentrations as affected by type of diet and level of zinc in normal calves. J. Nutr. 94: 391-401.
- Miller, W.J.; Pitts, W.J.; Clifton, C. M.; Morton, J.D. 1965a. 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 Sc. 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 Sc. 47: 556-558.
- Miller, W.J.; Powell, G.W.; Pitts, W.J. 1965b. Factors affecting zinc content of bovine hair. J. Dairy Sc. 48: 1091-1095.
- Miller, J.K; Ramsey, N.; Madsen, F.C. 1993. Elementos vestigiales. En: El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. D.C. Church. Ed. Acribia.
- 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.
- 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: 197-203.
- Morris, E.R.; Ellis, R. 1980. Effect of dietary phytate/zinc molar ratio on growth and bone zinc response of rats fed semipurified diets. J. Nutr. 110: 1037-1045.
- National Research Council. 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th Revised Edition. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 7th Revised Edition. National Academy Pres, Washington, D.C., USA.
- National Research Council. 2007. Nutrient Requirement of Small Ruminants. National Academies Press, Washington, D.C., USA.
- 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.
- O'Dell, B.L. 1984. Bioavailability of trace elements. Nutr. Rev. 42: 301-308.
- O'Dell, B.L.; Yoke, J.M.; Savage, J.E. 1964. Zinc availability in the chick as affected by phytate, calcium and ethylenediaminetetraacetate. Poult. Sci. 43: 415-419.
- 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.
- 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.; Stob, M.; Parker, H.E.; Beeson, W.M. 1965. Zinc deficiency syndrome in the young calf. J. Anim. Sci. 24: 735-741.
- 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.
- Payne, R.L.; Bidner, T.D.; Fakler, T.M.; Souther, L.L. 2006. Growth and intestinal morphology of pigs form sows fed twoo 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. 2001a. Efecto de la suplementación con óxido de zinc en bovinos para carne alimentados con forrajes marginalmente deficientes en zinc. Revista de Medicina Veterinaria. 82: 308-311.
- Pechin, G.H.; Tossoni, R.A.; Cavagión, L.J. 2001b. Pediluvio y vacunación como estrategias preventivas frente a la necrobacilosis interdigital en bovinos para carne. Ciencia Veterinaria 3: 41-48.

- 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.
- Pierson, R.E. 1966. Zinc deficiency in young lambs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 149: 1279-1282.
- Piper, K.G.; Higging, G. 1967. Estimation of trace metals in biological material by atomic absorption spectrophotometry. Proc. Ass. Clin. Biochem. 4: 190.
- Powell, G.W.; Miller, W.J.; Blackmon, D.M. 1967. Effects of dietary EDTA and cadmium on absorption, excretion, and retention of orally administered ^{65}Zn in various tissues of zinc-deficient and normal goats and calves. J. Nutr. 93: 203-212.
- 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.
- Ruksan, B.E. 1985. Mapa de microelementos en forrajeras de Argentina. Rev. Arg. Prod. Anim. 4 (supl. 3): 89-98.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Sc. 91: 1985-1995.
- Smart, M.E.; Cymbaluk, N.F. 1991. Trace Minerals. In: Large Animal Clinical Nutrition. J.M. Naylor and S.L. Ralston, Eds. Mosby Year Book, Inc. p. 55-67.
- Solomons, N.W.; Jacob, R.A.; Pineda, O.; Viteri, F.F. 1979. Studies on the bioavailability of zinc in man. III. Effect of ascorbic acid on zinc absorption. Am. J. Clin. Nutr. 32: 2495-2499.
- Somers, M.; Underwood, E.J. 1968. 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.
- 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.
- 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.; 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 stressed feeder calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199: 1731-1733.
- Steel, L.; Cousins, R.J. 1985. Kinetics of zinc absorption by luminally and vascularly perfused rat intestine. Am. J. Physiol. 248: G46-G53.
- Swinkels, J.W.; 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.
- 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.
- Tacnet, F.; Watkins, D.W.; Ripoche, P. 1990. Studies of zinc transport into brush-border membrane vesicles isolated from pig small intestine. Biochim. Biophys. Acta 1024: 323-330.

- Todd, W. R.; Elvehjem, C.A.; Hart, E.B. 1933. Zinc in the nutrition of the rat. Amer. J. Physiol. 107: 146-156.
- 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.; 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. CAB, London.
- 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 ^{65}Zn and on tissue concentrations of zinc, iron, and copper in ratas. 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.
- Voelker, H.H.; Jorgensen, N.E.; Mohanty, G.P.; Owens, M.J. 1969. Effects of zinc supplementation to dairy cattle rations. J. Dairy Sc. 52: 929-930 (Abstract).
- 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: 1346-1364.
- 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.; Gieseman, 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.
- Weigand, E.; Kirchgessner, M. 1976. Radioisotope dilution technique for determination of zinc absorption *in vivo*. Nutr. Metab. 20: 307-313.
- 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.
- 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.
- 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.