

# **Alimentación de corderos con una dieta deficiente en zinc: efecto sobre parámetros relacionados con la absorción y el metabolismo del cobre**

## **Feeding lambs with a zinc-deficient diet: effect on parameters related to copper absorption and metabolism**

PECHIN, GH<sup>1</sup>; GENERO, GA<sup>1</sup>; CSEH, SB<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam, calle 5 y 116, (6360) General Pico, La Pampa. <sup>2</sup>INTA Balcarce.

### **RESUMEN**

El objetivo de este ensayo fue estudiar el efecto del consumo de una dieta deficiente en zinc (Zn) sobre los niveles plasmáticos, la concentración tisular y la retención de cobre (Cu) en ovinos. Diez corderos fueron asignados aleatoriamente a dos grupos: basal (B; 10 ppm de Zn) y suplementado con 30 ppm de Zn (Z). El ensayo se extendió por el término de 20 semanas, con sangrados cada 4 semanas. En las semanas 6 y 20 se evaluó el balance de Cu. Al final del trabajo, se realizó la eutanasia y se recogieron muestras de músculo, hígado, páncreas, testículo, riñón, pulmón, hueso y lana para determinar la concentración de Cu. Los niveles de Cu plasmático solo fueron más bajos en el grupo Z en la última medición. En el primer período de balance, la digestibilidad aparente del Cu fue menor en el grupo Z (46,78 %) que en el grupo B (52,76 %), mientras que la retención de Cu tuvo una tendencia similar. Sin embargo, en el segundo período de balance no se detectaron diferencias entre los grupos. La concentración de Cu en hígado y en lana fue menor en el grupo Z. El resto de las variables no difirieron entre tratamientos. Estos resultados sugieren que la deficiencia de Zn incrementa la absorción del Cu y su concentración en hígado y lana.

**Palabras clave:** (deficiencia de zinc), (corderos), (cobre).

## SUMMARY

The objective of this trial was to study the effect of a diet deficient in Zn on Cu plasma levels, tissue concentrations and mineral retention in lambs. Ten lambs were randomly assigned to two groups: basal (B; 10 ppm of Zn) and supplemented with 30 ppm of Zn (Z). The trial lasted for 20 weeks. Blood samples were collected every 4 weeks by jugular venipuncture. In weeks 6 and 20, Cu balance was evaluated. At the end of the trial, euthanasia was performed and samples of muscle, liver, pancreas, testis, kidney, lung, bone and wool were collected to determine the concentration of Cu. Plasma Cu levels were only lower in group Z in the last sampling. In the first balance period, the apparent digestibility of Cu was lower in group Z (46.78 %) than in group B (52.76 %), while Cu retention had a similar trend. However, in the second balance period, no differences were detected between the groups. The Cu concentration in liver and wool was lower in group Z. The rest of the variables did not differ between treatments. These results suggest that zinc deficiency increases Cu absorption and its concentration in liver and wool.

**Key words:** (zinc deficiency), (lambs), (copper).

## INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas se han reconocido los efectos del antagonismo del zinc (Zn) sobre la absorción y el metabolismo del cobre (Cu), tanto en el hombre como en los animales domésticos<sup>18</sup>. Ott *et al.*<sup>12,13</sup> hallaron que la adición de 1.000 ppm de Zn como óxido de Zn (ZnO) en la dieta de corderos en crecimiento produce disminución de la eficiencia de conversión alimenticia y de los niveles de Cu en suero, y que la adición de 2.000 ppm de Zn, disminuye la ganancia de peso y los depósitos de Cu en hígado. Aunque estos autores no hallaron efectos negativos con la adición de 500 ppm de Zn, Saylor y Leach<sup>20</sup> demostraron que estos niveles pueden producir una disminución del Cu y de la actividad de la ceruloplasmina en plasma cuando la concentración de Cu dietario es relativamente baja. El límite máximo tolerable de Zn en alimentos para ovinos ha sido fijado en 300 mg/kg MS<sup>10</sup>, unas diez veces el requerimiento<sup>11</sup>. Sin embargo, no se ha establecido una máxima relación dietaria Zn/Cu, como se ha estudiado para otros antagonistas del Cu, como el molibdeno (Mo) y el hierro (Fe)<sup>21</sup>.

El Zn y el Cu se absorben en intestino delgado por mecanismos diferentes. La absorción del Zn involucra a dos proteínas: Zip4 en membrana

apical y ZnT1 en membrana basolateral<sup>9</sup>, mientras que la absorción de Cu se realiza a través de los transportadores CTR1 y, secundariamente, DMT1 en membrana apical y ATP7A en membrana basolateral<sup>4</sup>. De esta manera, es improbable que la interacción Zn-Cu se produzca a este nivel. La hipótesis dominante durante muchos años<sup>5</sup> sostenía que el alto consumo de Zn induce la síntesis de metalotioneína (MT) en la mucosa intestinal, la que se une al Cu y reduce su movimiento hacia la circulación. Esta hipótesis fue confrontada posteriormente por Reeves<sup>17</sup>, que sugiere que la inducción de la MT intestinal puede ser una estrategia de corto término para disminuir la absorción de algunos metales, pero que otros mecanismos más eficientes son puestos en marcha en exposiciones de largo término. Por otro lado, debido a que los ovinos son especialmente susceptibles a la intoxicación crónica con Cu<sup>3,21</sup>, el Zn se ha utilizado con fines preventivos, ya que induce también la síntesis de MT en hígado y facilita así la secuestro de Cu y su excreción biliar<sup>2</sup>.

En animales de interés productivo y de laboratorio, pocos ensayos han explorado las posibles interacciones entre Zn y Cu en el rango de concentraciones más cercanas a las naturalmente

halladas en los alimentos, o bien, cuando los niveles de Zn son deficientes, lo que podría, en algún grado, incrementar la absorción de Cu. El presente trabajo es parte de un ensayo en el que se utilizó un modelo de deficiencia de Zn, cuyos resultados fueron publicados en forma parcial<sup>14,15</sup> y que ha demostrado producir una disminución de varios parámetros, como la concentración de Zn en plasma y hueso, la retención de Zn y de nitrógeno y la producción de lana en ovinos.

Los objetivos de este ensayo incluyeron verificar el efecto del consumo de una dieta deficiente en Zn en corderos sobre los niveles plasmáticos y tisulares de Cu y la retención del mineral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Diez corderos de raza Corriedale, machos, de 75 días de edad y con un peso de  $10,09 \pm 1,285$  kg, fueron asignados en forma aleatoria a dos grupos, de acuerdo al nivel de Zn en la ración: basal (B) y suplementado con Zn (Z). Ambos grupos recibieron una dieta compuesta, en base materia seca (MS), por: 30 % de paja de trigo, 34,8 % de almidón de maíz, 14 % de sacarosa, 10 % de albúmina de huevo deshidratada, 2 % de aceite de girasol, 2 % de urea y 4,2 % de núcleo mineral-vitamínico sin Zn. La dieta B contenía 10 ppm de Zn, base MS, y la dieta Z fue la misma, pero suplementada con sulfato de zinc monohidratado ( $ZnSO_4 \cdot H_2O$ ), a un nivel extra de 30 ppm de Zn, para cumplir con las recomendaciones del NRC<sup>11</sup>. Ambas dietas fueron formuladas para alcanzar 10 ppm de Cu y contenían, en promedio, 0,20 % de azufre (S), 94 ppm de Fe y 0,7 ppm de Mo. 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.

El protocolo de manejo y de eutanasia de los animales fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. Los corderos fueron alojados en jaulas de plástico, de 1 m x 0,5 m, con piso ranurado. El ensayo tuvo una duración de 20 semanas. Al inicio del experimento, se esquiló un área de 80 cm<sup>2</sup> del flanco de cada cordero para obtener, al finalizar el ensayo, una muestra de lana correspondiente al periodo experimental y medir la concentración de Cu. Cada 4 semanas, se extrajo una muestra de sangre de vena yugular, utilizándose heparina como anti-coagulante. La muestra obtenida fue centrifugada

a 2.000 rpm, durante 10 minutos, y el plasma sobrenadante se separó para la posterior medición de los niveles de Cu. En la sexta y la última semana del trabajo se evaluaron la cantidad de Cu aparentemente digerido y el balance de Cu, de acuerdo a las siguientes fórmulas (todo en mg/día):

Cu aparentemente digerido = Cu consumido - Cu excretado en heces

Retención de Cu = Cu consumido - (Cu excretado en heces + Cu excretado en orina)

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 y pesaron diariamente. Se tomó una alícuota diaria de cada excreta (30 g para heces y 20 ml para orina), las que se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

Al finalizar el ensayo se realizó la eutanasia de los animales por exanguinación, previa anestesia con pentotal sódico. Se recogieron muestras de músculo (*longissimus dorsi*, supraescapular y semimembranoso), hígado, páncreas, testículo, riñón, pulmón, hueso (metacarpo y metatarso) y lana (de la porción esquilada al inicio del ensayo) para la determinación de los niveles de Cu, por espectrofotometría de absorción atómica<sup>16</sup>.

Las muestras de tejidos blandos fueron cortadas en trozos de 1 cm<sup>3</sup> 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 ( $HNO_3$ , 68 % V/V), 2 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ , 98 % V/V) y 2 ml de ácido perclórico ( $HClO_4$ , 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 h, enjuagadas con agua deionizada y llevadas a una mufla a 500 °C, durante 5 h. 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.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en un diseño completamente aleatorio. Para la variable concentración de Cu en plasma se utilizó un modelo mixto con mediciones repetidas en el tiempo (PROC MIXED, SAS/STAT 9.1)<sup>8,19</sup>. El modelo incluyó los efectos fijos de tratamiento, tiempo e interacción tratamiento x tiempo, el efecto aleatorio del animal dentro de tratamiento y el error experimental. Se usó una estructura de covarianza autorregresiva de orden 1 para varianzas homogéneas (AR1). Para el resto de las variables (concentración tisular y balance de Cu) se utilizó el procedimiento

PROC GLM, del mismo paquete estadístico, con un modelo que incluyó el efecto fijo de tratamiento y el error experimental.

### RESULTADOS

#### a. Primer período de balance.

Por diseño, el consumo de Cu no difirió entre grupos ( $P=0,249$ ). Aunque las diferencias numéricas no fueron grandes (52,8 % vs 46,8 %), hubo un efecto estadísticamente significativo ( $P<0,05$ ) de la adición de Zn sobre la digestibilidad aparente del Cu (Tabla 1), mientras que la retención porcentual de Cu tendió ( $P<0,10$ ) a ser menor en el grupo Z.

#### b. Segundo período de balance.

Como se observa en la Tabla 2, los efectos sobre la retención de Cu no se repitieron en el segundo ensayo de balance.

**Tabla 1.** Balance de Cu en corderos alimentados con una dieta basal (B) o suplementados con 30 ppm de Zn (Z). Primer período.

Variable	Grupo B	Grupo Z	EE	P
Consumo de Cu (mg/d)	3,531	3,559	0,022	0,249
Excreción de Cu en heces (mg/d)	1,668	1,893	0,069	0,011
Cu aparentemente digerido (mg/d)	1,863	1,666	0,082	0,043
Digestibilidad aparente del Cu (%)	52,758	46,784	2,124	0,023
Excreción de Cu en orina (mg/d)	0,096	0,060	0,024	0,171
Retención de Cu (mg/d)	1,768	1,605	0,096	0,131
Retención de Cu (%)	50,04	45,08	2,523	0,085

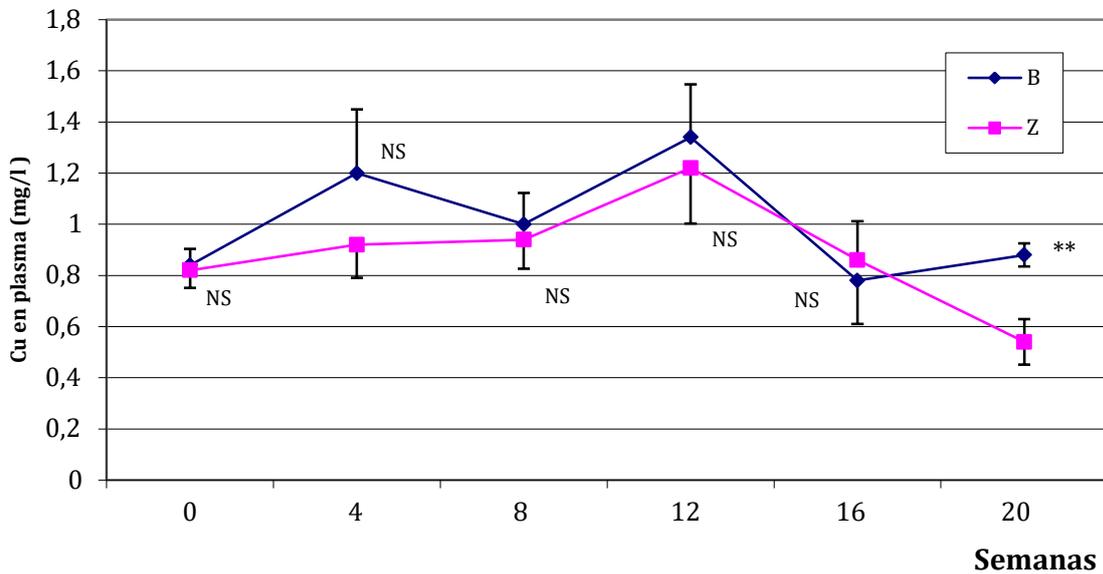
**Tabla 2.** Balance de Cu en corderos alimentados con una dieta basal (B) o suplementados con 30 ppm de Zn (Z). Segundo período.

Variable	Grupo B	Grupo Z	EE	P
Consumo de Cu (mg/d)	2,424	2,432	0,014	0,542
Excreción de Cu en heces (mg/d)	0,741	0,642	0,065	0,168
Cu Aparentemente digerido (mg/d)	1,682	1,790	0,075	0,192
Digestibilidad aparente del Cu (%)	69,38	73,57	2,772	0,169
Excreción de Cu en orina (mg/d)	0,078	0,053	0,020	0,251
Retención de Cu (mg/d)	1,604	1,737	0,082	0,148
Retención de Cu (%)	66,15	71,39	3,140	0,134

**c. Niveles de Cu en plasma.**

De acuerdo a la interacción Tratamiento x Tiempo ( $P < 0,10$ ) graficada en la Figura 1, los niveles de Cu plasmático solo fueron afectados por la suplemen-

tación con Zn en la última medición ( $P < 0,01$ ), en la que los grupos B y Z presentaron valores de 0,88 y 0,54 mg/l, respectivamente.



Efectos: Tratamiento:  $P = 0,054$ , Tiempo:  $P < 0,01$ ; Tratamiento x Tiempo:  $P = 0,087$ .

**Figura 1.** Medias ( $\pm$  DE) de la evolución del Cu plasmático en corderos alimentados con una dieta basal (B) o suplementados con 30 ppm de Zn (Z).

**d. Concentración de Cu en órganos**

Como se observa en la Tabla 3, el grupo B presentó mayor concentración de Cu en hígado ( $P < 0,05$ )

y en lana ( $P < 0,01$ ), con una tendencia en sentido inverso en páncreas.

**Tabla 3.** Concentración de Cu en órganos (mg/kg MS) de corderos alimentados con una dieta basal (B) o suplementados con 30 ppm de Zn (Z).

Órgano	Grupo B	Grupo Z	EE	P
Músculo semimembranoso	4,78	7,38	1,628	0,149
Músculo supraescapular	6,54	8,34	2,137	0,424
Músculo <i>longissimus dorsi</i>	6,70	5,28	1,609	0,403
Riñón	13,94	15,24	1,588	0,437
Pulmón	17,64	14,30	4,495	0,479
Hígado	227,80	132,10	32,554	0,019
Testículo	8,12	7,74	1,425	0,796
Páncreas	6,64	8,44	0,876	0,074
Metacarpo	5,94	5,34	0,930	0,537
Metatarso	5,29	4,88	0,593	0,509
Lana	9,26	6,54	0,716	0,005

## DISCUSIÓN

En nuestro trabajo, en el primer período 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, contrasta con lo hallado en situaciones de alimentación pastoril, en las que son más importantes otros antagonistas del Cu (Mo, Fe y S)<sup>21</sup>. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser corroborados en el segundo ensayo de balance. En otro trabajo similar, una suplementación de 30 ppm de Zn, en corderos alimentados con una dieta a base de forrajes que contenían entre 15 y 23 ppm de Zn, no modificó los niveles de Cu plasmático, la absorción aparente de Cu ni la retención de Cu, pero este ensayo fue de una duración relativamente corta (42 días)<sup>7</sup>. En un ensayo de 150 días<sup>6</sup>, la adición de una cantidad moderada de Zn (20 ppm) no tuvo efecto sobre el Cu sérico ni el balance de Cu. Sin embargo, la dieta del grupo control contenía 34 ppm de Zn, cantidad que cubre los requerimientos de Zn, de acuerdo al NRC<sup>11</sup>. Aliarabi *et al.*<sup>1</sup> tampoco encontraron efectos de la suplementación con 40 ppm de Zn en corderos sobre Cu plasmático, absorción aparente de Cu y retención de Cu, en un estudio en el que la dieta control contenía 22,5 ppm de Zn.

La menor concentración de Cu plasmático en el grupo Z con respecto al B en la última medición, sumado a la menor concentración del mineral en lana, podría suponer el efecto de una depleción progresiva de las reservas hepáticas de Cu, asociado con los menores niveles de Cu en hígado hallados al finalizar el ensayo en el grupo Z. Sin embargo, de acuerdo a la bibliografía<sup>21</sup>, 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. En este sentido, sería de interés explorar en futuros experimentos si el nivel de Cu hepático para sostener una cupremia normal es más elevado en ovinos en crecimiento.

A pesar de que existen trabajos que fallaron en demostrar una interacción Zn x Cu en ovinos, todos ellos utilizaron dietas basales con niveles mayores a los usados en nuestro estudio. En un ensayo similar al nuestro<sup>22</sup>, 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. La discrepancia entre los resultados alcanzados en los ensayos con ovinos puede obedecer, al menos en parte, a la concentración de Zn en la dieta basal contra la que se realizan las comparaciones. Es probable, entonces, que sean necesarios niveles de 4 a 10 ppm de Zn (un rango de deficiencia dietaria del mineral) para producir mejoras en la eficiencia de absorción del Cu. En qué grado este aumento en la absorción puede predisponer a una intoxicación crónica con Cu es un aspecto que amerita ser indagado. Contrariamente, una suplementación moderada de Zn por encima de niveles cercanos a los requerimientos (20 a 30 ppm de Zn) no parece producir efectos significativos sobre la absorción del Cu.

## CONCLUSIONES

Tomados en su conjunto, los resultados de este ensayo indican que la deficiencia de Zn en ovinos puede mejorar la absorción del Cu e incrementar su concentración en hígado y lana, aunque resta profundizar acerca de su relevancia biológica y productiva.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Aliarabi, H.; Fadayivar, A.; Tabatabaei, M.M.; Zamani, P.; Bahari, A.; Farahavar, A.; Dezfoulian, A.H. Effect of zinc source on hematological, metabolic parameters and mineral balance in lambs. *Biol Trace Elem Res.* 2015; 168:82-90.
2. Bremner, I. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Methods Enzymol.* 1991; 205:25-35.
3. Bremner, I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67(Suppl.):1069S-73S.
4. Doguer, C.; Ha, J.-H.; Collins, J.F. Intersection of iron and copper metabolism in the mammalian intestine and liver. *Compr Physiol.* 2018; 8:1433-61.
5. Fischer, P.W.F.; Firoux, A.; L'Abbé, M.R. Effects of zinc on mucosal copper binding and on the kinetics of copper absorption. *J Nutr.* 1983:462-69.
6. Garg, A.K.; Mudgal, V.; Dass, R.S. Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization and mineral profile in lambs. *Anim Feed Sci Technol.* 2008; 144:82-96.
7. Kegley, E.B.; Spears, J.W. Effect of zinc supplementation on performance and zinc metabolism of lambs fed forage-based diets. *J Agric Sci. (Cambridge).* 1994; 123:287-92.
8. Littell, R.C.; Henry, P.R.; Ammermann, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci.* 1998; 76:1216-31.
9. Maares, M.; Haase, H. A guide to human zinc absorption: General overview and recent advances of in vitro intestinal models. *Nutrients.* 2020; 12:762; doi:10.3390/nu12030762.
10. National Research Council. *Mineral tolerance of animals.* 2005. 2<sup>nd</sup> Revised Edition. National Academies Press, Washington, D.C., USA.
11. National Research Council. *Nutrient Requirements of Small Ruminants.* 2007. National Academies Press, Washington, D.C., USA.
12. Ott, E.A.; Smith, W.H.; Harrington, R.B.; Beeson, W.M. Zinc toxicity in ruminants. I. Effects of high levels of dietary zinc on gains, feed consumption and feed efficiency of lambs. *J Anim Sci.* 1966; 25:414-18.
13. Ott, E.A.; Smith, W.H.; Harrington, R.B.; Stob, M.; Parker, H.E.; Beeson, W.M. Zinc toxicity in ruminants. III. Physiological changes in tissues and alterations in rumen metabolism in lambs. *J Anim Sci.* 1966; 25:424-31.
14. Pechin, G.H.; Corbellini, C.N.; Cseh, S.B.; Stritzler, N.P. Efectos de la deficiencia subclínica de zinc en corderos sobre parámetros bioquímicos, concentración tisular y balance de zinc. *InVet.* 2018; 20:243-54.
15. Pechin, G.H.; Corbellini, C.N.; Denda, S.S. Efecto de la deficiencia subclínica de zinc en corderos sobre la retención de nitrógeno, parámetros productivos y hematológicos. *Cienc Vet.* 2021; 23:119-34.
16. Perkin Elmer. Analytical methods for atomic absorption spectroscopy. The PerkinElmer Corporation (Ed.). Branford, USA, 1996.
17. Reeves, P.G. Adaptation responses in rats to long-term feeding of high-zinc diets: emphasis on intestinal metallothionein. *J Nutr Biochem.* 1995; 6:48-54.
18. Sandstead, H.H. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61(Suppl.):621S-4S.
19. SAS Institute Inc. *SAS/STAT 9.1 User's Guide.* 2004. Cary, NC, USA.
20. Saylor, W.W.; Leach Jr, R.M. Intracellular distribution of copper and zinc in sheep: Effect of age and dietary levels of minerals. *J Nutr.* 1980; 110:448-59.
21. Suttle, N.F. *Mineral nutrition of Livestock.* Fourth Edition. CAB International. Wallingford. UK. 2010.
22. White, C.L.; Martin, G.B.; Hynd, P.I.; Chapman, R.E. The effect of zinc deficiency on wool growth and skin and wool follicle histology of male Merino lambs. *Br J Nutr.* 1994; 71:425-35.