UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

CONSECUENCIAS PRODUCTIVAS Y REPRODUCTIVAS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN BOVINOS

AUTOR: **GALARZA**, Esteban Martín.
DIRECTOR: **Dr. ANCHORDOQUY**, Juan Mateo
DIRECTOR: **Dr. FAZZIO**, Luis Emilio.

LUGARES DE TRABAJO: **Laboratorio de Nutrición Mineral, Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP)**; **Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, IGEVET, Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP-CONICET).**

MIEMBROS DEL JURADO:
Dr. CÉTICA, Pablo Daniel.
Dr. PRANDO, Alberto José.
Dr. TESTA, Juan Alberto.

Año 2020

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, el Dr. Luis E. Fazzio y el Dr. Juan Mateo Anchordoquy, por ser tan generosos y desinteresados a la hora de brindarme sus conocimientos. Por su apoyo, su paciencia y su dedicación para guiarme por el camino de la investigación. Por su excelente predisposición en todo momento. Por su amistad.

Al Dr. Guillermo A. Mattioli, que es parte fundamental de mi formación, por su inestimable generosidad y dedicación. Por su amistad.

Al Dr. Mauricio Giuliodori por su siempre buena predisposición para colaborar en los análisis estadísticos. Por confiar en mí y apoyarme como docente. Por su amistad.

A la Dra. Cecilia C. Furnus, por su apoyo y por abrirme de manera desinteresada las puertas del laboratorio.

A la Dra. Diana E. Rosa, por su cálida ayuda y enseñanza en los análisis de laboratorio.

A Raúl Lizarraga, por su acompañamiento diario y su ayuda en todos los trabajos realizados. Por su amistad.

A Ramiro Rearte, por sus aportes en los análisis estadísticos y junto a Luis Quintero, por su compañía diaria en estos años. Por su amistad.

A Belén Ventura, por su colaboración en el laboratorio y por estar siempre predispuesta a ayudar. Por su amistad.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional de La Plata, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de grado como por haberme becado para realizar mis estudios de posgrado.

Al Laboratorio de Reproducción del Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (IGEVET) por brindar sus recursos y conocimientos. En especial a Patricio Anchordoquy y a Nicolás Farnetano, por su predisposición para enseñar y ayudar. Por su amistad.

A Maite, por su amor incondicional y su apoyo infinito. Por su corazón tan generoso y su compañía invaluable.

A mi familia y amigos, por ser parte fundamental de mi vida, por estar siempre. En especial a Graciela y Chingolo, por criarme con libertad, por alentarme a continuar mi formación profesional y por su apoyo incondicional. Por su amor.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES EN REVISTAS CON REFERATO

Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, **Galarza EM**, Farnetano NA, Giuliodori MJ, Nikoloff N, Fazzio LE, Furnus CC. Parenteral Zinc Supplementation Increases Pregnancy Rates in Beef Cows. Biol Trace Elem Res. 2019; 192(2): 175-182.

Galarza EM, Lizarraga RM, Streitenberger N, Arriaga G, Abraham G, Mattioli GA, Anchordoquy JM, Fazzio LE. Assessment of Plasma Zinc and Total Leukocyte Count in Calves Experimentally Infected With Mannheimia Haemolytica. Biol Trace Elem Res. 2020; [Online].

Galarza EM, Lizarraga RM, Anchordoquy JP, Farnetano NA, Furnus CC, Fazzio LE, Anchordoquy JM. Zinc supplementation within the reference ranges for Zn status in cattle improves spermatozoa quality without modifying in vitro fertilization performance. Anim Reprod Sci. 2020. (Aceptado para su publicación).

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

Galarza EM, Anchordoquy JP, Furnus CC, Mattioli GA, Fazzio LE, Anchordoquy JM. Efecto del zinc sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática del espermatozoide bovino descongelado y su capacidad de unión a la zona pelúcida. 3° Congreso Internacional de la Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias. Buenos Aires, 2 y 3 de junio de 2016. Argentina.

Galarza EM, Lizarraga RM, Pascua AM, Furnus CC, Anchordoquy JP, Anchordoquy JM. Efecto de la suplementación con zinc en el medio de fecundación in vitro de ovocitos bovinos sobre la formación de pronúcleos. XVIII Congreso y 15avas Jornadas de

Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas. La Plata, 29 y 30 de Septiembre de 2016. Argentina.

Galarza EM, Lizarraga RM, Mattioli GA, Galván WR, Raggio SJ, Rosa DE, Fazzio LE. Variaciones de Zn en Terneros Infectados con *Mannheimia Haemolytica.* XXII Reunión Científico Técnica Asociacion Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Río Cuarto, 14 al 17 de noviembre de 2018. Argentina.

Galarza EM, Lizarraga RM, Anchordoquy JP, Fazzio LE, Anchordoquy JM. Efecto del zinc sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos. XX Congreso de Ciencias Morfológicas 18vas Jornadas De Educación en Ciencias Morfológicas. La Plata, 29 y 30 de octubre de 2020. Argentina. (Enviado para su publicación).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS XI

TÍTULO: CONSECUENCIAS PRODUCTIVAS Y REPRODUCTIVAS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN BOVINOS XIV

RESUMEN XIV

SUMMARY XVI

CAPÍTULO 1: RELEVAMIENTO DE CONCENTRANCIONES PLASMÁTICAS DE ZINC EN BOVINOS DE LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RÍO SALADO 1

1.1 INTRODUCCIÓN 1

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS 4

1.2.1 Muestras de sangre 4

1.2.2 Procesamiento de las muestras 4

1.2.3 Análisis estadístico 5

1.3 RESULTADOS 6

1.4 DISCUSIÓN 8

1.5 CONCLUSIÓN 11

CAPÍTULO 2: ASOCIACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE ZINC EN SUELO, FORRAJE Y PLASMA DE BOVINOS EN UN PARTIDO DE LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RÍO SALADO 12

2.1 INTRODUCCIÓN 12

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS 13

2.2.1 Diseño y selección de los establecimientos 13

2.2.2 Toma de muestras 14

2.2.3 Procesamiento y análisis de muestras 15

2.2.4 Análisis estadístico 16

2.3 RESULTADOS 17

2.4 DISCUSIÓN 19

2.5 CONCLUSIÓN 24

CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PARENTERAL CON ZINC SOBRE LA GANANCIA DIARIA DE PESO EN TERNEROS DURANTE LA ETAPA DE CRÍA E INGRESO A UN SISTEMA DE ENGORDE A CORRAL 25

3.1 INTRODUCCIÓN 25

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS 27

3.2.1 Animales y diseño experimental utilizados para el objetivo 1 (terneros durante la etapa de cría) 27

3.2.2 Animales y diseño experimental utilizados para el objetivo 2 (terneros que ingresan a un sistema de engorde a corral) 28

3.2.3 Recolección de muestras de sangre y determinación de Zn 29

3.2.4 Análisis estadístico 29

3.3 RESULTADOS 30

3.3.1 Efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre la GDP de terneros al pie de la madre. 30

3.3.2 Efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre la GDP de terneros durante el período de adaptación a un sistema de engorde a corral. 32

3.4 DISCUSIÓN 33

3.5 CONCLUSIÓN 35

CAPÍTULO 4: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PARENTERAL CON ZINC EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ DE HEMBRAS BOVINAS ADULTAS 36

4.1 INTRODUCCIÓN 36

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS 37

4.2.1 Locación y animales de experimentación 37

4.2.2 Protocolo de IATF 37

4.2.3 Grupos experimentales 38

4.2.4 Muestras de sangre 38

4.2.5 Concentración de Zn plasmático 38

4.2.6 Medición de hormonas 38

4.2.7 Ultrasonografía 39

4.2.8 Análisis estadístico 39

4.3 RESULTADOS 40

4.3.1 Animales 40

4.3.2 Efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre la zincemia 40

4.3.3 Efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre el AFP, ACL, concentración plasmática de E2 y P4 y el porcentaje de preñez. 41

4.4 DISCUSIÓN 43

4.5 CONCLUSIÓN 46

CAPÍTULO 5: EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ZINC SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN BOVINOS 47

5.1 INTRODUCCIÓN 47

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS 48

5.2.1 Reactivos y medios 48

5.2.2 Análisis de la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática del espermatozoide y de la motilidad espermática 49

5.2.3 Evaluación del estatus acrosomal 50

5.2.4 Maduración, fertilización y cultivo *in vitro* 51

5.2.5 Prueba de unión de espermatozoides a la zona pelúcida (ZP) 52

5.2.6 Formación de pronúcleos 52

5.2.7 Concentración de zinc en el medio de FIV 52

5.2.8 Análisis estadístico 53

5.3 RESULTADOS 53

5.3.1 Determinación de Zn en el medio de FIV 53

5.3.2 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides y en la motilidad espermática 53

5.3.3 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre el EA . 55

5.3.4 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre la unión de espermatozoides a la ZP 55

5.3.5 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre la formación de pronúcleos 56

5.3.6 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre el desarrollo embrionario posterior 57

5.4 DISCUSIÓN 58

5.5 CONCLUSIÓN 61

CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN DE LA ZINCEMIA EN TERNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* 63

6.1 INTRODUCCIÓN 63

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS 65

6.2.1 Criterio de inclusión 65

6.2.2 Formación de grupos y desafío experimental 65

6.2.3 Muestras de sangre 66

6.2.4 Procesamiento de las muestras 66
6.2.5 Evaluación clínica 67
6.2.6 Eutanasia y evaluación de lesión de lesión pulmonar 67
6.2.7 Cultivo bacteriológico 68
6.2.8 Análisis estadístico 68
6.3 RESULTADOS 68
6.4 DISCUSIÓN 71
6.5 CONCLUSIÓN 73
CONCLUSIONES FINALES 74
ANEXOS 75
6.1 Método Wisconsin para el diagnóstico de Enfermedad Respiratoria en bovinos de leche 75
BIBLIOGRAFÍA 76

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

µg: microgramo

µL: microlitro

µM: micromolar

°C: grados Celsius

ACL: área del cuerpo lúteo

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFP: área del folículo preovulatorio

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

CDRS: Cuenca Deprimida del Río Salado

CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

CIV: cultivo *in vitro*

CL: cuerpo lúteo

CO2: dióxido de carbono

COC: complejo ovocito-cumulus

Cu/Zn-SOD: cobre/zinc superóxido dismutasa

Cu: cobre

dL: decilitro

E2: estradiol

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EA: estatus acrosomal

EEM: Error estándar de la media

ERB: enfermedad respiratoria bovina

FCV: Facultad de Ciencia Veterinarias

FITC-PSA: *Pisum sativum* aglutinina marcada con isotiocianato de flurescéina

FIV: fertilización *in vitro*

FP: folículo preovulatorio

FSH: hormona folículo estimulante

g: fuerza G de aceleración

GC: grupo control

GDP: ganancias diarias de peso

GI: grupo infectado

h: horas

HCl: ácido clorhídrico

HOST: prueba de hinchazón hipoosmótica

IATF: inseminación artificial a tiempo fijo

IBR: rinotraqueitis infecciosa bovina

IC: intervalo de confianza

IM: intramuscular

kg: kilogramo

L: litro

LH: hormona luteinizante

M: molar

mg: miligramo

M. haemolytica: Mannhemia haemolytica

MIV: maduración *in vitro*

mL: mililitro

mM: milimolar

MMC: medias de los mínimos cuadrados

Mn: manganeso

mOsm: miliosmol

MP: motilidad progresiva

MS: materia seca

n: número

N_2: nitrógeno

nm: namómetros

NRC: National Research Council

O_2: oxígeno

ONF: ovocitos no fecundados

OR: *odds ratio*

p/v: peso/volumen

P4: progesterona

PBS: solución *buffer* de fosfato

pH: potencial hidrógeno

PN: pronúcleos

RA: reacción acrosómica

RIA: radioinmunoensayo

rpm: revoluciones por minuto

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SFB: suero fetal bovino

SOFM: fluido oviductal sintético modificado

T°: temperatura

TALP: Tiroides-albúmina-lactato-piruvato

v/v: volumen/volumen

Zn: zinc

ZnT: *Zinc Transporter*

ZP: zona pelúcida

CONSECUENCIAS PRODUCTIVAS Y REPRODUCTIVAS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN BOVINOS

Palabras claves: zinc, deficiencia mineral, rumiantes, ganancia diaria de peso, reproducción.

RESUMEN

El presente trabajo consistió en evaluar las consecuencias productivas y reproductivas de la deficiencia de zinc (Zn) en bovinos de producción de carne en la Cuenca Deprimida del Río Salado (CDRS). Los objetivos fueron: 1) evaluar el estatus de Zn en vacas de la CDRS; 2) evaluar la asociación del estatus de Zn con la concentración de Zn en el suelo y forraje; 3) evaluar el efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre la ganancia diaria de peso (GDP) en terneros al pie de la madre o al ingreso de un engorde a corral, y 4) sobre el porcentaje de preñez en vacas bajo un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo; 5) evaluar el efecto de la suplementación con Zn en el medio de fecundación *in vitro* (FIV) sobre la calidad espermática y el desarrollo embrionario. Se utilizaron bovinos clínicamente sanos, en los que se determinó el estatus de Zn por medio de la zincemia. También, se utilizó como modelo experimental la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos obtenidos de ovarios bovinos de frigorífico. Los resultados mostraron que: 1) el 31,4% de las vacas presentaron deficiencia de Zn, 2) no hubo asociación entre la concentración de Zn en el plasma bovino, suelo y forraje, 3) la suplementación con Zn no modificó la GDP en terneros, 4) pero aumentó la tasa de preñez en vacas y 5) la suplementación con Zn en el medio de FIV mejoró la calidad espermática sin modificar el desarrollo embrionario temprano. Según los resultados obtenidos se evidencia que existe deficiencia de Zn en bovinos de la CDRS, que la suplementación parenteral con Zn mejora la performance reproductiva en

vacas de cría y, por último, que la suplementación con Zn en el medio de FIV mejora la calidad espermática.

PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE CONSEQUENCES OF ZINC DEFICIENCY IN CATTLE

KEY WORDS: zinc, mineral deficiency, beef cattle, average daily gain, reproduction.

SUMMARY

The present thesis consisted of evaluating the productive and reproductive consequences of zinc (Zn) deficiency in beef cattle from the Salado River basin (SRB). The objectives of the work were: 1) to assess Zn status in cows from the SRB, 2) to evaluate the association of cattle Zn status with soil and forage Zn concentration, 3) to evaluate the effect of parenteral Zn supplementation on average daily gain (ADG) in calves with their dams or at feedlot arrival and 4) on pregnancy rates in cows undergoing fixed-time artificial insemination protocol, and 5) to evaluate the effect of Zn supplementation to *in vitro* fertilization (IVF) medium on sperm quality and early embryo development. Clinically healthy bovines were used, in which the Zn status was determined by plasma Zn concentration. The *in vitro* production of embryos from oocytes obtained from slaughterhouse bovine ovaries was used as an experimental model. The results obtained showed that: 1) 31.4% of cows had zinc deficiency, 2) there was no association between bovine plasma, soil and forage Zn concentration, 3) parenteral Zn supplementation did not affect ADG in calves, 4) but increased the cow pregnancy rate, and 5) Zn supplementation to the IVF medium improved sperm quality but did not modify early embryo development. The current results confirm Zn deficiency in SRB beef cattle. They also indicate that parenteral Zn supplementation can be a useful tool to improve reproductive rates in cows. Furthermore, Zn supplementation to IVF medium improves sperm quality.

CAPÍTULO 1

RELEVAMIENTO DE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ZINC EN BOVINOS DE LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RÍO SALADO

1.1 INTRODUCCIÓN

La producción de bovinos de carne es una de las principales actividades agropecuarias de la Provincia de Buenos Aires. Esta provincia aporta el 34% del ganado bovino para carne del país, con más 15,7 millones de cabezas (Rossanigo y col., 2012). La mayor densidad de bovinos de la provincia se encuentra en la región productiva denominada Cuenca Deprimida del Río Salado (CDRS) (SENASA, 2015). La CDRS tiene una producción anual de terneros cercana a los 2 millones de cabezas, lo que representa el 34% de la existencia provincial y el 17% de la nacional, lo que la convierte en la principal zona de cría de terneros del país (Némoz y col., 2013). Esta región se encuentra en el centro este de la provincia, y si bien no tiene una delimitación rigurosamente definida, está compuesta por más de veinte partidos. Los principales partidos que la componen son: Ayacucho, Azul, Castelli, Chascomús, Dolores, General Alvear, General Belgrano, General Guido, General Lavalle, General Madariaga, General Paz, Las Flores, Lezama, Lobos, Magdalena, Maipú, Pila, Punta Indio, Rauch, Roque Pérez, Saladillo, San Miguel del Monte, Tapalqué y Tordillo (Mattioli, 1998; Némoz y col., 2013; Ministerio de Agroindustria, 2015). Esta región es una extensa llanura anegable, debido a la poca pendiente y problemas de drenaje, con clima templado húmedo y un promedio de precipitaciones anuales próximo a los 1000 mm (Otondo, 2011; Rojas y col., 2011). Como su nombre lo indica, la CDRS drena sus aguas superficiales principalmente al río Salado, aunque también cuenta con otros cauces naturales que realizan el drenaje de la zona, como el río Samborombón y los arroyos

Langueyú, Tandileofú y Chelforó (Ministerio de Obras Públicas, 2010; Scarpati y Capriolo, 2013).

La producción ganadera de la zona es de tipo extensiva, en la cual la alimentación de los bovinos depende en un 75% de pastizales naturales, seguido de pasturas implantadas y verdeos, con muy poca participación de suplementación con alimentos concentrados (Vázquez y col., 2008; Faverin y Machado, 2019). El hecho de que haya una baja implementación de la suplementación, condiciona a los animales a que reciban del forraje verde los nutrientes necesarios para un adecuado desempeño productivo. Dentro de estos nutrientes se encuentran los microminerales, es decir, minerales esenciales que se requieren en pequeñas cantidades, en el orden de los miligramos por día, como es el caso del cobre (Cu), el selenio, el manganeso, el iodo, el cobalto, el hierro y el zinc (Zn) (Mattioli, 2019a). La concentración de microminerales en el forraje depende de muchos factores, como la concentración del mineral y el pH en el suelo, su solubilidad, la especie forrajera y el estado fenológico del forraje, entre otros (Nicholas, 1975; Robson, 1993; Tyler y Olsson, 2001). Si la concentración de estos minerales en el forraje es menor a la requerida por los animales, sobrevienen los cuadros de deficiencias (Suttle, 2010). Para el caso del Zn, si bien no están del todo definidos los requerimientos en bovinos en pastoreo, la concentración en la pastura debe ser de al menos 30 mg/kg de materia seca (MS) (NRC, 2016). El Zn es un mineral esencial ya que cumple un rol estructural, catalítico y regulatorio de la actividad celular (Levaot y Hershfinkel, 2018). En este sentido, más de 2800 proteínas son dependientes de Zn, entre ellas más de 300 metaloenzimas y alrededor del 10% de las proteínas asociadas a la transcripción génica (Tapiero y Tew, 2003; Andreani y col. 2006; Andreani y Bertini, 2012). Las enzimas dependientes de Zn cumplen funciones muy variadas y forman parte de la mayoría de las vías metabólicas del organismo (Vallee y Falchuk, 1993; Kambe y col., 2015; Olechnowicz y col, 2018). Este mineral, por ejemplo, es necesario para la división y diferenciación celular, ya que participa en la síntesis y en la transcripción del ADN (Valle

y Falchuk, 1993; Bonaventura y col., 2015). Actúa en la defensa antioxidante, debido a que forma parte de la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD), induce la síntesis de proteínas con capacidad antioxidante como la metalotioneína, y compite por los sitios de unión en las membranas biológicas con otros metales que inducen peroxidación (Lee, 2018). El Zn interviene en la respiración celular y en el equilibrio ácido base ya que cumple un rol catalítico en la enzima anhidrasa carbónica (Lindskog, 1997). Por todo lo expuesto, no resulta llamativo que la deficiencia de este mineral genere consecuencias variadas tales como alopecia, paraqueratosis, fallas en la respuesta inmune, alteraciones en la función reproductiva y alteraciones en el crecimiento reflejadas como bajas ganancias de peso (Taneja y Kaur, 1990; Engle y col., 1997; Ibs y Rink, 2003; Alsaad y col., 2006; Suttle, 2010; Fallah y col., 2018).

Si bien, para determinar el estatus de Zn en animales se han utilizado diversos indicadores, como la concentración de Zn en tejidos como pelo e hígado, o la actividad de las enzimas dependientes de Zn como la fosfatasa alcalina; la concentración plasmática del mineral es el más utilizado debido a su practicidad (Kincaid, 1999; Herdt ahd Hoff, 2011). Existe acuerdo en considerar normal a valores de zincemia (concentración plasmática o sérica) por encima de 90 µg/dL, mientras que valores menores a 80 µg/dL indicarían carencia, dejando entre ambos un rango de carencia marginal (Enjalbert y col., 2006; Mattioli, 2019a). Si bien en la CDRS existen antecedentes de forrajes con concentraciones de Zn por debajo de lo requerido por los bovinos (Cseh y col., 1997; Ramírez y col., 1998), poco se conoce acerca del estatus de Zn en el ganado de dicha región.

La hipótesis de este trabajo es que existe carencia de Zn en bovinos de la CDRS. Por lo tanto, el objetivo fue evaluar la concentración plasmática de Zn en vacas de cría, en distintos partidos que componen la CDRS.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Las prácticas en animales fueron aprobadas bajo el Protocolo para el Uso de Animales de Investigación Científica (Identificación interna Nº 51-5-15T) del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata.

Se realizó un estudio observacional, entre enero de 2015 y diciembre de 2019, en 110 establecimientos de cría bovina pertenecientes a 20 Partidos de la CDRS. Los establecimientos seleccionados realizaban, al momento del muestreo, una producción de cría extensiva, sin suplementación oral de minerales. Se tomaron muestras de sangre de un total de 1078 vacas (entre 7 y 12 animales por establecimiento) con al menos un parto en su vida y clínicamente sanas.

1.2.1 Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron tomadas con ayuda de los médicos veterinarios particulares de los establecimientos. La extracción se realizó de la vena yugular con agujas y jeringas estériles nuevas y depositadas en tubos plásticos con heparina sódica como anticoagulante, previamente lavados con detergente no iónico y en una solución de ácido nítrico al 5% (v/v). Las muestras fueron remitidas refrigeradas dentro de las 12 horas de la extracción al Laboratorio de Nutrición Mineral de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional de La Plata, o según la cercanía, a uno de los tres laboratorios que colaboraron con este trabajo (Laboratorio Regional Rauch, partido de Rauch; Bazkos Viejos, partido de General Madariaga; o CSG, Laboratorio de Diagnóstico Veterinario, partido de Lezama).

1.2.2 Procesamiento de las muestras

El primer paso (el único realizado en los laboratorios colaboradores) consistió en la separación del plasma por medio de centrifugación a 3000 rpm x 5 minutos. Una vez obtenido el plasma se depositó en viales plásticos nuevos y se conservó a -20°C, para su posterior envío con refrigeración a la FCV para continuar con su procesamiento. Para la

determinación de la concentración de Zn, el plasma fue desproteinizado con ácido tricloracético al 10% (p/v) y centrifugado a 5000 rpm x 10 minutos. Con el sobrenadante obtenido se determinó la concentración de Zn por espectrofotometría de absorción atómica de llama (AAnalyst 200 – PerkinElmer, AAS, International Equipment Trading Ltd., Mundelein, USA). Para el procedimiento se utilizaron estándares internos de 0, 50, 100 y 200 µg/dL de Zn.

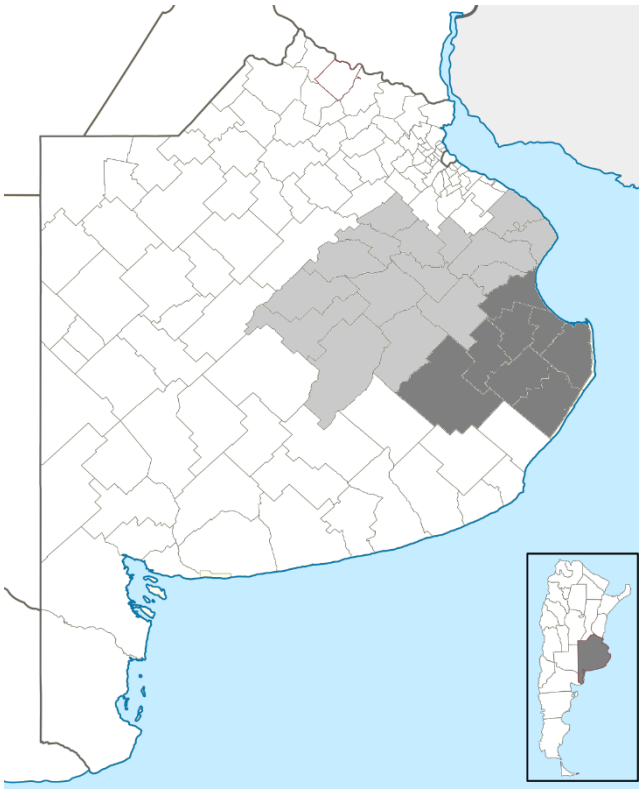
1.2.3 Análisis estadístico

Para explicar la variación en la zincemia se realizó una regresión lineal con el procedimiento MIXED del programa de análisis estadístico SAS (SAS 9.4, Inst. Inc.). Las variables que se utilizaron para explicar la variación de la zincemia fueron el año de muestreo (2015, 2016, 2017, 2018 y 2019), la estación del año (invierno, primavera, verano y otoño), la región de drenaje de las aguas superficiales a la cual pertenecen los partidos relevados (Región de los ríos Salado y Samborombón, y Región Atlántica Oriental; Figura 1.1) y la interacción entre las dos últimas (estación del año * región de drenaje). La Región de los ríos Salado y Samborombón está compuesta por los partidos que drenan sus aguas superficiales a los ríos Salado y Samborombón, y a los arroyos Las Flores, Azul y Tapalqué, mientras que la Región Atlántica Oriental está compuesta por los partidos que drenan sus aguas superficiales a los arroyos Langueyú, Tandileofú y Chelforó (Ministerio de Obras Públicas, 2010).

Los animales dentro de cada rodeo se clasificaron según sus valores de zincemia en normales ≥ 90 y deficientes < 90 µg/dL (Enjalbert y col., 2006). La proporción de animales deficientes se analizó a través de un modelo de regresión logística con el procedimiento GLIMMIX de SAS, en el cual se utilizó una distribución binomial y enlace Logit. Como variables explicativas también se utilizaron el año de muestreo, la estación del año, las regiones de drenaje y la interacción entre las dos últimas (estación del año * región de drenaje).

Se realizaron modelos univariados para determinar que variables explicativas se ofrecieron a los dos modelos multivariados finales, para lo cual se seleccionaron las variables que tuvieron un valor de $P < 0,15$. Se quitaron manualmente del modelo multivariado final aquellas variables con $P > 0,1$. Se consideró significativo un valor de $P \leq 0,05$ y se consideraron tendencias valores de $P \leq 0,1$.

Figura 1.1. Partidos relevados de la Cuenca Deprimida del Río Salado, divididos en dos regiones de desagüe natural (río o arroyo) de aguas superficiales.



La Región de los ríos Salado y Samborombón (gris claro) está comprendida por los partidos que drenan sus aguas superficiales hacia los ríos Salado y Samborombón, y hacia los arroyos Las Flores, Azul y Tapalqué. La Región Atlántica Oriental (gris oscuro) está comprendida por los partidos que drenan sus aguas superficiales a los arroyos Langueyú, Tandileofú y Chelforó (Ministerio de Obras Públicas, 2010).

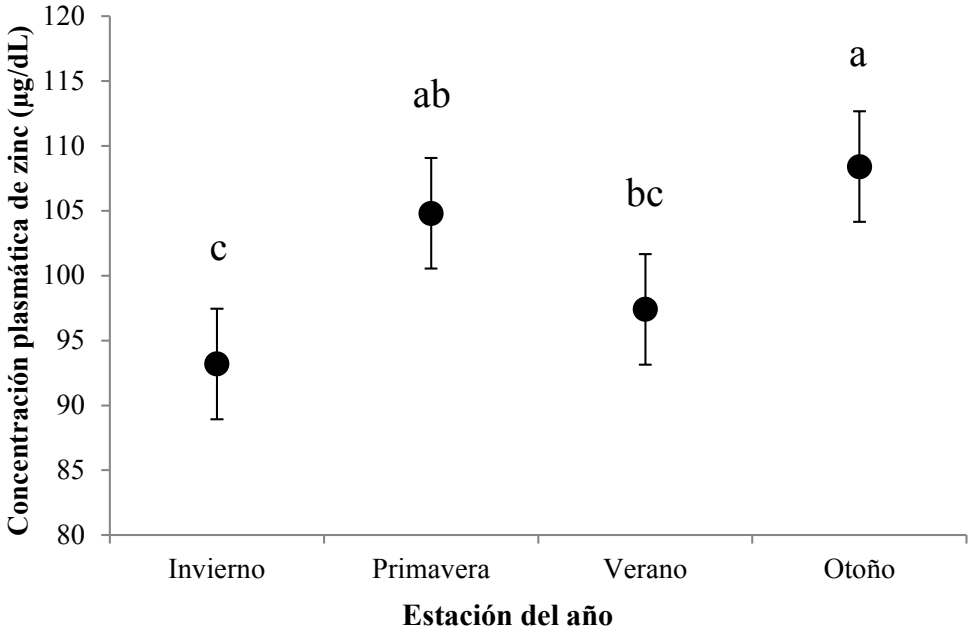
1.3 RESULTADOS

La media general de las zincemias considerando todos los rodeos fue de 102,8 ± 16,4 µg/dL. En promedio, el 31,4% de las vacas de cada rodeo presentaron valores de

deficiencia (< 90 µg/dL). Las zincemias se vieron afectadas solamente por la estación del año (P < 0,01). El resto de las variables explicativas fueron removidas del modelo final de evaluación (P > 0,1). En otoño la media de la zincemia fue mayor que en invierno y verano (P < 0,01), y en la primavera las zincemias fueron superiores a las observadas en invierno (P = 0,04; Figura 1.2).

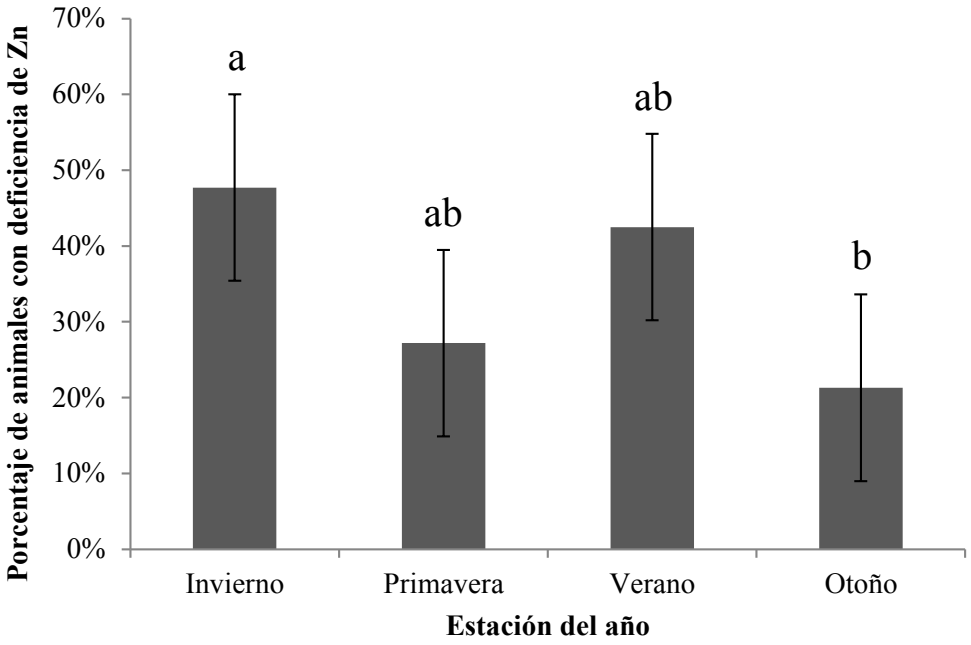
Con respecto al porcentaje de animales deficientes, la estación del año tendió a modificarlo (P = 0,1). Durante el otoño hubo un porcentaje menor de animales deficientes en el rodeo comparado con los valores de invierno (21,3 y 47,7%, respectivamente, P = 0,03; Figura 1.3). El resto de las variables explicativas no fueron utilizadas en el modelo final de evaluación (P > 0,1).

Figura 1.2. Efecto de la estación del año sobre la concentración plasmática de zinc (µg/dL) de vacas de cría de la CDRS



Los valores son expresados como media de los mínimos cuadrados ± error estándar de la media para cada estación. Diferentes letras indican diferencias entre estaciones (P < 0,05).

Figura 1.3. Efecto de la estación del año sobre el porcentaje de animales con estatus plasmático deficiente de Zn.



Los valores son expresados como media de los mínimos cuadrados ± error estándar de la media para cada estación. Diferentes letras indican diferencias entre estaciones ($P < 0,05$). Se consideraron animales deficientes aquellos que tuvieron una concentración de Zn en plasma menor a 90 µg/dL.

1.4 DISCUSIÓN

Tanto las zincemias como el porcentaje de animales deficientes dentro del rodeo se comportaron de manera similar en los distintos años de estudio. Lo mismo sucedió con la distribución espacial de estas dos variables, ya que tanto en la Región de los ríos Salado y Samborombón como en la Región Atlántica Oriental se observaron valores similares de zincemias y porcentaje de animales deficientes. Si bien esta división se realizó de manera arbitraria, ya que no existen antecedentes que permitan inferir diferencias entre estas regiones, nos permite interpretar que el estatus de Zn de los rodeos de la CDRS se comporta de manera similar en su extensión.

El hecho de que las zincemias varíen según las estaciones del año podría estar reflejando cambios estacionales en las concentraciones de Zn en el forraje. En este sentido, se han reportado variaciones estacionales en la concentración de Zn en forrajes en diferentes países, aunque lamentablemente no coinciden entre sí. En Argentina, en la

provincia de Formosa, Bernardis y col. (2005) reportaron que las concentraciones de Zn en pastizales en otoño fueron mayores que en verano. En Uruguay, con un sistema de cría similar a la CDRS, Pittaluga Rossi (2018) informó que la concentración de Zn en los pastizales fue mayor en invierno y primavera, mientras que Ungerfeld (1998), en el mismo país, reportó concentraciones mayores de Zn en el período otoño-invernal. En Noruega, Brekken y Steinnes (2004) observaron que algunas especies forrajeras contenían mayores concentraciones de Zn en primavera. Si bien no hay un patrón claro de variación según las estaciones climáticas, cambios en las concentraciones de Zn en el forraje a lo largo del año podrían explicar, al menos en parte, las variaciones observadas en el estatus de Zn en las vacas de la CDRS.

Los requerimientos de minerales pueden variar en función del estado fisiológico en el que se encuentren las vacas (Mattioli, 2019a). En el invierno el porcentaje de animales deficientes por rodeo fue mayor que en el otoño. El invierno, es la época de pariciones en la región, ya que entre el 50 y el 80% de los establecimientos (dependiendo el grado de tecnificación) realizan el servicio durante la primavera (Maresca y col., 2011; Gómez, 2015; Faverin y Machado, 2019). Esto implica que durante el invierno las vacas se encuentran finalizando su gestación o en lactancia temprana. Los resultados hallados en el presente trabajo podrían deberse al aumento en la demanda de Zn por parte del feto al final de la gestación (Masters y Somers, 1980) y a un aumento en la excreción de Zn a causa de la lactancia, ya que la leche posee una concentración de 3 a 5 mg de Zn/L (Suttle, 2010). Por otro lado, durante el otoño, generalmente las vacas se encuentran gestando y sin amamantar, ya que habitualmente el destete de los terneros se realiza en esta época del año (Carrillo, 2007; Faverin y Machado 2019), lo que podría explicar por qué en esta estación el porcentaje de vacas con deficiencia de Zn en el rodeo es menor respecto al invierno.

Existen pocos antecedentes en el país de relevamientos realizados con el fin de evaluar el estatus de Zn en rodeos bovinos. En el partido de Magdalena (parte de la

CDRS), Ramírez y col. (1998) realizaron un relevamiento de 13 establecimientos donde evaluaron bovinos mayores y menores a 2 años, en otoño y primavera, y observaron que durante el otoño hubo un mayor porcentaje de animales con zincemias menores a 80 µg/dL. En el partido de General Villegas (noroeste de la provincia de Bs. As.) se reportaron valores de zincemias más elevados durante el invierno en vacas de un establecimiento donde la base forrajera consistió en pasturas implantadas y verdeos, mientras que en otro establecimiento cuya fuente forrajera principal fue el pastizal natural, las vacas no presentaron variación estacional (Buffarini y col., 2008). También en General Villegas, Minatel y col., (2004) relevaron las zincemias en novillos, terneros y vaquillonas de 10 establecimientos ganaderos en invierno y verano, observando que para estas categorías, el valor medio en invierno fue menor al observado en verano (68,5 y 80,5 µg/dL, respectivamente). En el partido de Balcarce (sudeste de la provincia de Bs. As.), Cseh y col. (1998) reportaron que tanto vacas como terneras en el mes de junio tuvieron zincemias más altas que en octubre y diciembre, mientras que en otro campo de la misma localidad la tendencia de las zincemias en vaquillonas fue opuesta, ya que se produjo un aumento de estas en octubre y diciembre, comparado con los valores de junio. En el partido de Guaminí (centro oeste de la provincia de Bs. As.), Coria y col. (2013) realizaron un seguimiento estacional de las zincemias de vacas en un establecimiento por dos años (2011 y 2012), en el cual no evidenciaron diferencias entre estaciones y en todos los muestreos los valores medios de zincemia se encontraron entre 60 y 70 µg/dL. En la localidad de Coronel Cornejo (norte de la provincia de Salta), Micheloud y col. (2017) evaluaron las zincemias en vacas y terneras de reposición en las cuatro estaciones del año, sin evidenciar diferencias por estación y con valores medios por encima de 90 µg/dL en las cuatro estaciones en las dos categorías. Balbuena y col. (1989), en un estudio realizado en vacas en lactancia y terneros en crecimiento (entre 1 y 2 años de edad) en 11 establecimientos del este de las provincias de Formosa y Chaco, reportaron que el 30% de las muestras presentaban valores de zincemia por debajo de 80 µg/dL, sin haber

diferencias entre categorías. Al evaluar estos antecedentes en conjunto, resulta evidente que su variabilidad impide hacer generalizaciones con respecto al comportamiento de las zincemias en rodeos de cría. Por ende, parecería adecuado relevar las zonas destinadas a la cría bovina de manera individual.

El hecho de que el 31,4% de las vacas presentaron valores de zincemia por debajo de lo normal indica que existe el riesgo potencial de que la eficiencia productiva de la ganadería en la CDRS se vea afectada por la deficiencia de Zn. La deficiencia de Zn en el bovino genera menores ganancias diarias de peso, asociadas a una reducción en el apetito como a una menor eficiencia de conversión (Engle y col., 1997; Suttle, 2010; Alsaad y col., 2006). Si bien poco se sabe acerca del efecto de la deficiencia de Zn en la reproducción de la hembra bovina, se la ha vinculado a la disminución de la fertilidad, la retención placentaria y la pérdida de la gestación (Enjalbert y col., 2006). En terneros machos, por otro lado, esta deficiencia genera un menor desarrollo testicular (Miller y Miller, 1962; Pitts y col., 1966). Además, animales deficientes de Zn son más susceptibles a enfermarse debido a fallas de la respuesta inmune celular y humoral, alteraciones en la respuesta inflamatoria y daño de la defensa antioxidante (Engle y col., 1997; Ibs y Rink, 2003; Bonaventura y col., 2015; Mattioli, 2019a). El conocimiento acerca de la incidencia de la deficiencia de Zn en el ganado bovino de la CDRS, así como también en el resto del país, permitirá optimizar su manejo nutricional y zootécnico incrementando su productividad.

1.5 CONCLUSIÓN

Las zincemias de vacas en rodeos de cría de la CDRS mostraron una distribución homogénea, con un valor medio de 102,8 ± 16,4 µg/dL, y un 31,4% de las vacas de cada rodeo con valores de deficiencia. Los valores de zincemia variaron según las estaciones del año, con menor porcentaje de animales deficientes en otoño y mayor porcentaje durante el invierno.

CAPÍTULO 2

ASOCIACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE ZINC EN SUELO, FORRAJE Y PLASMA DE BOVINOS EN UN PARTIDO DE LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RÍO SALADO

2.1 INTRODUCCIÓN

La producción de bovinos de carne es una de las actividades agropecuarias más importantes en la Pcia. de Bs As. La cría bovina se realiza principalmente en las denominadas zonas marginales, que son aquellas donde no se consiguen altos rendimientos de cultivos (Maresca y col., 2011). Como ya ha sido mencionado, la principal zona dedicada a la cría de bovinos en la provincia de Bs. As. es la CDRS (Ministerio de Agroindustria, 2015). Esta región está comprendida por 24 partidos y presenta características edafológicas y climáticas similares en toda su extensión (Mattioli, 1998). El sistema de producción es extensivo, en el cual la principal fuente de alimento de los bovinos son los pastizales naturales, con baja a nula suplementación con alimentos concentrados (Vázquez y col., 2008; Faverin y Machado, 2019). La principal fuente de Zn para los bovinos que se encuentran en pastoreo y no tienen ningún tipo de suplementación, es el forraje (Suttle, 2010). La concentración del Zn en el forraje depende de varios factores, como la concentración de Zn disponible en el suelo y el pH del mismo (Robson, 1993). También se han reportado variaciones de los valores de Zn en el forraje según las estaciones del año (Ungerfeld, 1998; Pittaluga Rossi, 2018). Existen antecedentes que demuestran que los forrajes presentes en algunos partidos de la CDRS (Maipú, General Madariaga y Magdalena) no cubren los requerimientos de Zn en el bovino (Cseh y col., 1997; Ramírez y col., 1998).

En bovinos de producción de carne los requerimientos de Zn serian cubiertos cuando la dieta posee 30 mg Zn/kg de MS (NRC, 2016). Sin embargo, la bibliografía no

contempla las posibles diferencias de requerimiento entre las categorías animales (terneros, novillos, vacas, etc.), ni se encuentra bien definido en animales en pastoreo (NRC, 2016). El consumo de Zn por debajo de los valores requeridos conduce a un estado de carencia (Suttle, 2010). La carencia de Zn en bovinos genera fallas en el crecimiento, en la reproducción y en el sistema inmune (Mattioli, 2019a). Como mencionamos en el capítulo 1, el parámetro más utilizado para determinar el estatus de Zn es su concentración plasmática, considerándose adecuado cuando la zincemia presenta valores ≥ 90 µg/dL (Enjalbert y col., 2006).

La hipótesis de este trabajo es que las concentraciones de Zn en el suelo y forraje se asocian a los niveles plasmáticos de Zn en el bovino. El objetivo del trabajo consistió en evaluar, durante las cuatro estaciones del año, el estatus de Zn en vacas y terneros, y su asociación con la concentración de Zn en el suelo y forraje en un partido de la CDRS.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Las prácticas realizadas en animales fueron aprobadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata, bajo el Protocolo para el Uso de Animales de Investigación Científica (Identificación interna Nº 51-5-15T).

2.2.1 Diseño y selección de los establecimientos

Se realizó un estudio observacional longitudinal, en bloques completos al azar, para el cual se seleccionaron 6 establecimientos de cría bovina pertenecientes al partido de Chascomús (CDRS), Provincia de Buenos Aires. Al momento de la selección de los establecimientos se tuvo en cuenta el manejo (servicio estacionado en primavera, reposición de vientres con vaquillonas propias, principal recurso forrajero el pastizal natural, sin suplementación mineral por vía oral -bateas y/o bloques-) y que contara con accesos e instalaciones necesarias para la toma de muestras de sangre. Los establecimientos incorporados al presente estudio fueron: Chacra Experimental

Chascomús (35º 74´ 33" S, 58º 05´ 70" O), Instituto Tecnológico Chascomús (35º 62´ 42" S, 57º 99´ 27" O), establecimiento Los Yuyos (35º 42´ 56" S, 58º 06´ 30" O), establecimiento Sauce Grande (35º 64´ 70" S, 57º 96´ 28" O), establecimiento San Martín (35º 54´ 60" S, 58 º 12´ 52" O) y Don Canale (35º 44´ 71" S, 58º 14´ 70" O).

2.2.2 Toma de muestras

Muestras de sangre, forraje y suelo fueron tomadas en cada una de las visitas realizadas a los establecimientos en las cuatro estaciones del año (una visita por estación). El ensayo se realizó entre el invierno de 2017 y el otoño de 2018.

En cada visita se tomaron al azar 10 bovinos adultos (vacas) y 10 bovinos jóvenes (terneros), clínicamente sanos, a los cuales se extrajo una muestra de sangre para determinar la concentración plasmática de Zn. La extracción de la muestra se realizó con agujas y jeringas estériles y descartables. La sangre se depositó en tubos plásticos con heparina sódica como anticoagulante, previamente lavados con solución ácida (HNO_3 al 5%). Las muestras fueron inmediatamente refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 3 h posteriores a la extracción.

Las muestras de forrajes se tomaron en el lugar (potrero) donde se encontraban los animales al momento de la visita. La muestra consistió en 6 submuestras de distintos puntos del potrero, teniendo en cuenta la topografía del mismo. En aquellos en donde había media loma (terreno llano) y bajo (terreno anegable) se realizaron muestreos por separado para cada zona (6 submuestras por zona), mientras que en los potreros parejos (solo media loma) se realizó un único muestreo. El corte del forraje se realizó con tijeras de acero inoxidable, dejando una altura remanente similar a la que dejaban los animales y evitando el forraje que los animales no consumían. Las muestras se colocaron y conservaron en bolsas de papel hasta su posterior procesamiento en el laboratorio, durante el mismo día de recolectada la muestra.

Las muestras de suelo se recogieron en los mismos puntos donde se tomaron las muestras de forraje, también respetando la topografía del potrero. Se tomaron 10 cm de la

capa superficial de suelo utilizando tubos plásticos previamente lavados con HCl, donde se conservaron hasta su posterior procesamiento.

2.2.3 Procesamiento y análisis de muestras

La sangre fue centrifugada a 3000 rpm x 5 minutos para obtener el plasma, el cual fue desproteinizado con ácido tricloracético al 10% (p/v) y centrifugado a 5000 rpm x 10 minutos. A partir del sobrenadante obtenido se determinó la concentración de Zn por espectrofotometría de absorción atómica de llama (AAnalyst 200 – Perkin Elmer).

El forraje se lavó tres veces con agua desionizada para quitar los restos de tierra y se secó en estufa con aire forzado a 60°C por 48 h hasta peso constante y luego fueron molidas en un molino Willey, hasta pasar por un tamiz de 100 mesh, y se conservaron en tubos plásticos previamente lavados con HCl. Posteriormente se realizó una digestión ácida, para la cual se colocaron 250 mg de muestra molida y 3 mL de una mezcla de ácidos nítrico y perclórico (2:1) en tubos de borosilicato, los cuales se mantuvieron en bloque de calentamiento a 100°C por 48 h. Una vez finalizada la digestión se evaporó el contenido hasta llegar a un volumen mínimo, el cual fue resuspendido en ácido clorhídrico 0,1 N (csp 5 mL). La concentración de Zn se determinó en la suspensión obtenida por espectrofotometría de absorción atómica de llama (A. Analyst 200 – Perkin Elmer).

Las muestras de suelo se homogeneizaron y se secaron a temperatura ambiente por 48 h, al resguardo de cualquier contaminación ambiental. Posteriormente las muestras fueron molidas en un mortero de ágata hasta pasar por un tamiz plástico de 2 mm. Para la determinación del pH se suspendieron 5 g de suelo en 10 mL de agua desionizada con pH 7 en un tubo plástico de 50 mL. Seguido a esto, se agitó manualmente la suspensión durante 1 minuto, luego se dejó reposar 30 minutos y por último se realizó la lectura con pHmetro (Osorio, 2012). Para la determinación de Zn se colocaron 15 g de suelo en tubos plásticos lavados con HCl y cubiertos con papel de aluminio, a los que se les agregó 30 ml de solución extractante EDTA 0,2 M con un pH de 7,5. Los tubos se agitaron

durante una hora en un agitador tipo vaivén. Luego, se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm y se filtraron con papel Whatman 42. La concentración de Zn se determinó en el líquido obtenido de la filtración por espectrofotometría de absorción atómica de llama (A. Analyst 200 – Perkin Elmer).

2.2.4 Análisis estadístico

Para explicar la variación en las concentraciones de Zn en plasma, forraje y suelo se realizaron tres modelos de regresión lineal por medio del procedimiento MIXED de SAS (SAS 9.4, Inst. Inc.). Las variables utilizadas para explicar la variación en la zincemia fueron el pH del suelo, la concentración de Zn en el suelo, la concentración de Zn en el forraje, la estación del año (otoño, invierno, primavera y verano), la categoría animal (vaca y ternero) y la interacción entre las dos últimas (estación del año * categoría animal). En cuanto a las primeras tres variables explicativas mencionadas (pH del suelo, concentración de Zn en suelo y concentración de Zn en forraje), en aquellos potreros donde había bajo y media loma, y por lo tanto dos valores para cada una de las variables, se realizó un promedio de los mismos. Las variables utilizadas para explicar la variación de la concentración de Zn en el forraje fueron; el pH del suelo, la concentración de Zn del suelo, la estación del año, la topografía (bajo y media loma) y la interacción entre las dos últimas (estación del año * topografía). Para explicar la variación en la concentración de Zn en el suelo se utilizaron como variables el pH del suelo, la estación del año, la topografía y la interacción entre las dos últimas (estación del año * topografía). Se realizaron modelos univariados para determinar las variables explicativas ofrecidas a cada modelo multivariado final, seleccionando aquellas variables que tuvieron un valor de $P < 0,15$. Se quitaron manualmente del modelo multivariado final aquellas variables con $P > 0,1$. En todos los casos, el establecimiento fue analizado como bloque, el cual fue removido del modelo si el valor de $P > 0,1$.

Por último, los valores individuales de zincemia se separaron en dos niveles, normal ≥ 90 y deficiente < 90 µg/dL. Se realizó el análisis de animales deficientes con un

modelo de regresión logística con el procedimiento GLIMMIX de SAS, para el cual se utilizó una distribución binomial y el enlace Logit. Se utilizaron las mismas variables explicativas que para la evaluación de la zincemia (el pH del suelo, la concentración de Zn en el suelo, la concentración de Zn en el forraje, la estación del año, la categoría animal y la interacción -estación del año * categoría animal-). Para la selección de las variables ofrecidas en el modelo final se realizaron modelos univariados como se mencionara más arriba. El establecimiento también fue analizado como bloque, el cual fue removido del modelo si el valor de $P > 0,1$. En todos los casos se consideró significativo un valor de $P \leq 0,05$ y tendencia un valor de $P \leq 0,1$.

2.3 RESULTADOS

El valor medio de las zincemias analizadas fue de 105 ± 17 µg/dL, donde el 74,6% de los bovinos tuvieron un valor considerado normal (≥ 90 µg/dL), mientras que el 25,4% presentaron valores de deficiencia (< 90 µg/dL). Las zincemias se vieron afectadas por la estación del año ($P < 0,01$), con una tendencia a diferenciarse entre establecimientos ($P = 0,07$). El pH del suelo, la concentración de Zn en el suelo, la concentración de Zn en el forraje, la categoría animal y la interacción (estación del año * categoría animal) fueron removidas del modelo final de evaluación ($P > 0,1$). En primavera la media de la zincemia fue 118 ± 4,1 µg/dL y fue más alta que en el resto de las estaciones ($P < 0,03$), mientras que no se observó diferencias entre verano, otoño e invierno (103,4 ± 5,2; 100,1 ± 4,1 y 95,6 ± 4,6 µg/dL, respectivamente; $P > 0,27$).

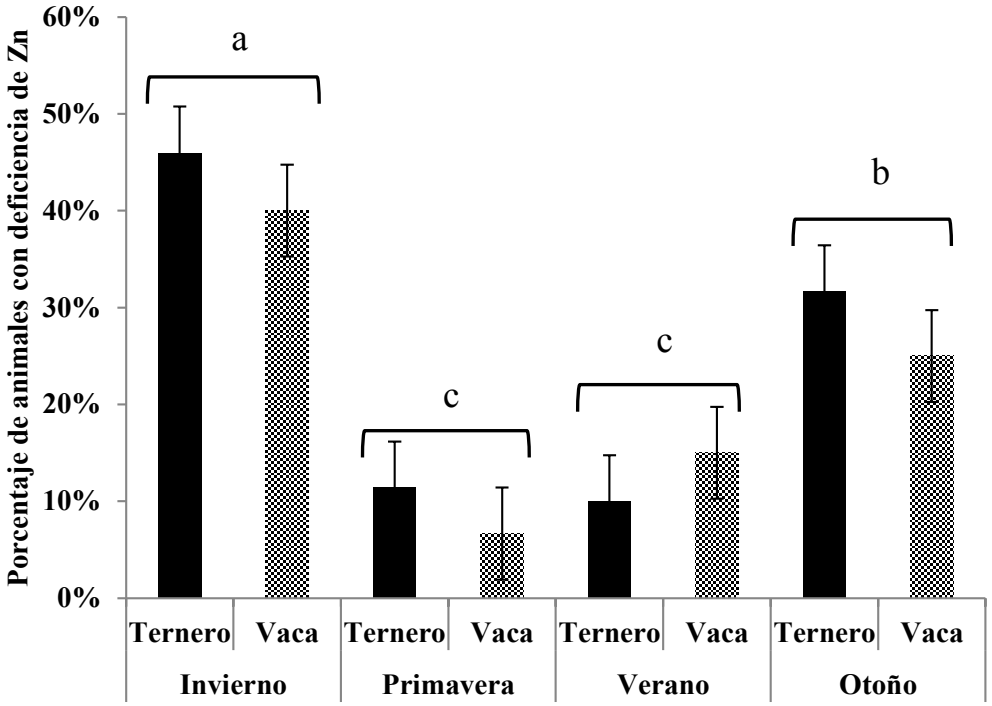
El porcentaje de animales deficientes se vio afectada solamente por la estación del año ($P < 0,01$). El pH del suelo, la concentración de Zn en el suelo, la concentración de Zn en el forraje, la categoría animal, la interacción (estación del año * categoría animal) y el bloque (establecimiento) fueron removidos en el modelo final de evaluación ($P > 0,1$). En invierno se observó el mayor porcentaje de animales deficientes (43%; $P < 0,02$), seguido por el otoño (28,3%; $P < 0,01$) y por último el verano y la primavera, los

cuales no se diferenciaron estadísticamente entre ellos (12,5% y 9,2%, respectivamente; P = 0,45; Figura 2.1).

En cuanto a las muestras de forrajes, la media general de la concentración de Zn fue 26,6 ± 11 mg/kg (MS), de las cuales el 69,7% de las muestras analizadas tuvo una concentración de Zn menor al requerimiento de 30 mg/kg (MS). La concentración de Zn en el forraje se vio afectada por la estación del año, la topografía y la interacción entre ellos (P < 0,01). El pH del suelo, la concentración de Zn en el suelo y el bloque (establecimiento) fueron removidos del modelo final de evaluación (P > 0,1). La interacción se observó debido a que el forraje del bajo, tanto en otoño como en verano, tuvo mayor concentración de Zn que el forraje de la media loma (P < 0,01; Tabla 2.1).

Las determinaciones realizadas en suelo arrojaron una media en la concentración de Zn de 5,1 ± 4,1 mg/kg, mientras que la media del pH evaluado fue 6,1 ± 1. En cuanto a la concentración de Zn en el suelo, solo se vio afectada por la topografía, ya que el bajo presentó mayor concentración de Zn que la media loma (7,2 y 3,9 mg/kg, respectivamente; P = 0,01). El pH del suelo, la estación del año, la interacción (estación del año * topografía) y el bloque (establecimiento) fueron removidos del modelo final de evaluación (P > 0,1).

Figura 2.1. Efecto de la estación del año sobre el porcentaje de animales con estatus plasmático deficiente de Zn.



Diferentes letras indican diferencias entre estaciones (P < 0,05). No hubo efecto de la categoría ni de la interacción categoría*estación (P > 0,52). Se consideraron animales deficientes aquellos que tuvieron una concentración de Zn en plasma menor a 90 µg/dL.

Tabla 2.1. Efecto de la estación del año y de la topografía del suelo sobre la concentración de Zn en el forraje (mg/kg de materia seca ± error estándar de la media).

Estación del año	Topografía		Valor de P
	Bajo	Media loma	
Invierno	28,6 ± 3,7	30 ± 3,1	0,78
Primavera	29,6 ± 4,7	23,6 ± 3,3	0,3
Verano	29,6 ± 3,7	15,9 ± 3,3	< 0,01
Otoño	56 ± 5,8	23 ± 2,7	< 0,01

Los valores son expresados como medias de los mínimos cuadrados.

2.4 DISCUSIÓN

Tanto la concentración de Zn plasmático, como el porcentaje de animales con estatus deficiente de Zn, no se vieron afectados por la concentración de Zn en el forraje. Si bien el Zn que ingresa por vía digestiva es fundamental para mantener el estatus del mineral en el organismo, se ha demostrado que la zincemia, a pesar de ser el principal

indicador de estatus de Zn en bovinos, varía en respuesta a distintas situaciones como el estrés, la inflamación y/o infección (Lichten y Cousins, 2009; Aydemir y col., 2012; Aburto-Luna y col., 2017, Galarza y col., 2020). En este trabajo, los valores más altos de zincemia se observaron en la primavera, tanto en vacas como en terneros, no existiendo diferencias entre categorías. En esta estación, los animales se encuentran en plena lactancia (Carrillo, 2007). Debido a que la leche es una buena fuente de Zn para los terneros, ya que tiene una concentración de 3 a 5 mg/L, podría explicar, al menos en parte, los niveles más altos de zincemia en terneros en primavera, que coincide con el momento de mayor producción de leche de la vaca (Carrillo, 2007; Suttle, 2010). En este momento se podría esperar una disminución en la zincemia en las vacas debido a las pérdidas de Zn producidas a través de la glándula mamaria, lo cual no sucedió. En un trabajo realizado por Anton y col. (2013) se demostró que las vacas tienden a incrementar su zincemia luego de 140 días de lactancia a pesar de recibir una concentración constante de Zn en su alimento. Además, en el mismo trabajo, se encontró una correlación positiva ($r = 0,451$) entre la producción de leche y la concentración plasmática de Zn, a los 84 días de lactancia.

Al igual que lo observado en el capítulo anterior, en invierno, el porcentaje de animales deficientes fue más alto. Esta época del año coincide con el final de la gestación y parición de las vacas (Maresca y col., 2011). Este hallazgo coincide con otros autores, que observaron disminución de la zincemia, tanto en el último tercio de gestación como en el período de periparto en rumiantes (Dufty 1977; Masters y Somers, 1980; Goff y Stabel, 1990). Como se planteó en el capítulo 1, estos resultados podrían deberse al aumento en la demanda de Zn por parte del feto al final de la gestación (Masters y Somers, 1980). En ovinos, el feto, en el último tercio de gestación tiene 7 veces más cantidad de Zn en comparación con el segundo tercio (Hansard y Mohammed, 1968; Williams y col., 1978). Otra posible explicación podría ser el aumento de la excreción de

Zn a través del calostro, el cual tiene una concentración del mineral entre 3 y 5 veces superior respecto a la leche (Goff y Stabel, 1990; Suttle, 2010).

Otra causa de la falta de asociación entre la concentración Zn en el forraje y la zincemia observada en este trabajo, pudo ser que la biodisponibilidad de Zn en las especies forrajeras varien según la época del año y estado fenológico. En un estudio realizado en ovinos en Venezuela se observó que la digestibilidad aparente del Zn en algunas especies forrajeras disminuía, en otras aumentaba, mientras que en otras, no se modificaba con el aumento de la madurez (Perdomo y col. 1977).

En bovinos en pastoreo, los trabajos en los que se relaciona el estatus de Zn y la concentración del mineral en el forraje, son escasos. En un estudio realizado en Zimbabue (Ndebele y col., 2005) observaron una correlación positiva (r = 0,67) entre las concentraciones de Zn en forraje y en tejidos bovinos. Hashemi (2018) no encontró correlación entre el contenido de Zn en el alimento consumido por vacas de distintos establecimientos y el contenido de Zn en el hígado, músculo o riñón. Además, el autor reportó que la estación del año no afectó dicho resultado (Hashemi, 2018). En un trabajo realizado en Indonesia se observó que, si bien durante la estación lluviosa el porcentaje de muestras que no cubrían los requerimientos de Zn en forraje (menores de 30 mg/kg de MS) fue mayor, las vacas presentaron valores de zincemias más altos en comparación con la estación seca (Prabowo y col., 1991). Por otro lado, Masters y Somers (1980) no encontraron correlación en el contenido de Zn en el forraje y la zincemia de ovejas en Australia.

Si bien la concentración de Zn en el suelo es un factor importante para garantizar el aporte de este mineral al forraje, en este trabajo no se observó asociación entre la concentración de Zn en el suelo y el forraje. Distintos factores pueden alterar la disponibilidad del Zn para la pastura, determinando, en parte, la concentración del mineral en ésta. Entre estos factores se encuentra el pH, el tipo y la humedad del suelo, los contenidos de otros minerales y de materia orgánica, la proporción de arcilla y la

microbiota del suelo (Broadley y col., 2007). De los factores mencionados el pH es el que impacta en mayor medida sobre la disponibilidad de Zn del suelo, ya que influye sobre la fracción soluble de Zn de la cual se nutre la planta (Robson, 1993; Broadley y col., 2007). La disminución del pH del suelo incrementa dicha fracción y por lo tanto el Zn biodisponible (Robson, 1993; Broadley y col., 2007). En este trabajo, el pH del suelo probablemente favoreció la disponibilidad de Zn ya que presentó un valor medio de 6,1 ± 1 (ácido) a lo largo del año, sin diferencias entre el terreno bajo y la media loma. Por otro lado, la concentración de Zn en el suelo tuvo variación solo en función de la topografía, pero con niveles medios altamente superiores al mínimo requerido para un crecimiento normal del forraje, tanto en el bajo como en la media loma (0,5 a 1 mg/kg; Sims y Johnson, 1991). A pesar de ello, como ya se mencionó anteriormente, casi el 70% de los forrajes analizados no alcanzaron los valores necesarios para cubrir los requerimientos en los bovinos. Esta falta de asociación entre la concentración de Zn en el suelo y la concentración de Zn el forraje pudo deberse a los diferentes estados de madurez al momento del corte, ya que hay evidencia que demuestra que al aumentar la madurez en el forraje disminuye la concentración de Zn (Gladstones y Loneragan, 1966; Perdomo y col., 1977; Givens y col., 2000). Esto se debería principalmente a que el Zn se encuentra en mayor concentración en las hojas que en los tallos, y al avanzar el estado de madurez del forraje la relación hoja:tallo disminuye (Davey y Mitchel, 1968; Givens y col., 2000). Otra posible explicación a esta falta de asociación es que en el presente ensayo se utilizaron la concentración de Zn y el pH como únicos predictores de la disponibilidad de Zn en el suelo lo que podría resultar insuficiente. Otros autores sugieren que la combinación de distintas variables tales como el pH, el contenido de materia orgánica y de fósforo, el porcentaje de arcilla y la capacidad de intercambio catiónico, debe ser considerada para lograr una apropiada predicción de la disponibilidad de Zn en el suelo (Alley y col., 1972; Junus y Cox, 1987; Sims y Johnson, 1991).

Tanto en verano como en otoño, el forraje del bajo tuvo mayor concentración de Zn que el de la media loma. Este hecho coincide con que a lo largo del año el bajo tuvo mayor concentración de Zn en el suelo. En un estudio realizado en dos partidos pertenecientes a la CDRS (Maipú y Magdalena) no se encontraron variaciones estacionales en muestras de pastizales y pasturas implantadas (Cseh y col. 1997). Por otro lado, Ungerfeld (1998) reportó en Uruguay, mayores concentraciones de Zn en el forraje en otoño e invierno, comparado con primavera y verano, sin observar diferencias entre el bajo y la loma. En otro estudio, también realizado en Uruguay (Pittaluga Rossi, 2018), se reportaron mayores concentraciones de Zn en pastizales en invierno y primavera. Estas diferencias entre los trabajos pueden estar dadas por distinta disponibilidad del Zn en suelo, el estado fenológico del forraje al momento del corte y por las especies que componen la muestra. En general las leguminosas tienen mayor concentración de Zn que las gramíneas, y a su vez, también hay diferencias en la concentración de Zn entre especies (Gladstones y Loneragan, 1966; Givens, 2000; Brekken y Steinnes, 2004).

Tanto en los resultados observados en este trabajo como en el capítulo 1, la deficiencia de Zn en bovinos de la CDRS se manifestó principalmente en el invierno. Respecto al resto de las estaciones existieron algunas diferencias entre los dos trabajos, principalmente en el verano, donde en el capítulo 1 el porcentaje de animales deficientes alcanzó el 42,5%, mientras que en el presente ensayo fue de 12,5%. Suponiendo que en los diferentes partidos de la CDRS la concentración de Zn en el forraje a lo largo del año se comporta de manera similar, la diferencia registrada en el capítulo 1 (realizado en 20 partidos de la cuenca) respecto al capítulo 2 (realizado en el partido de Chascomús) pudo ser causada por variaciones en las superficies (bajo o media loma) asignadas para el pastoreo de los rodeos. Cabe recordar que en verano la concentración de Zn en el forraje de la media loma fue de solo 15 mg/kg de MS, mientras que el pastizal del bajo presentó prácticamente el doble de ese valor (29,6 mg/kg de MS).

2.5 CONCLUSIÓN

En el partido de Chascomús, existe el riesgo de carencia de Zn en bovinos. El porcentaje de animales deficientes aumenta en las estaciones de otoño e invierno sin encontrarse asociado a la concentración de Zn en el forraje. Existen variaciones de la concentración de Zn en el forraje en función de la estación climática y la topografía del terreno. Dicha concentración no se encuentra asociada a la cantidad de Zn presente en el suelo.

CAPÍTULO 3

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PARENTERAL CON ZINC SOBRE LA GANANCIA DIARIA DE PESO EN TERNEROS DURANTE LA ETAPA DE CRÍA E INGRESO A UN SISTEMA DE ENGORDE A CORRAL

3.1 INTRODUCCIÓN

El Zn es un mineral traza esencial, el cual es requerido para lograr el desarrollo y el crecimiento normal de los animales (Mattioli, 2019a). Su carencia genera una menor performance productiva en bovinos, asociado principalmente a menores ganancias diarias de peso (GDP), reducción del apetito y menor eficiencia de conversión alimenticia (Suttle, 2010). Animales que consumen un alimento con una concentración de Zn menor a 30 mg/kg de MS podrían no cubrir los requerimientos diarios del mineral, generando un estado de carencia y afectando de este modo el desempeño productivo (NRC, 2016). Para determinar estados de carencia en el bovino, el indicador más utilizado es la zincemia (Herdt ahd Hoff, 2011). Sin embargo, como ya se ha mencionado, este indicador puede resultar poco confiable dado que se han observado variaciones de su valor en situaciones de estrés, infecciones e inflamación, entre otras (Aburto-Luna y col., 2017). Además, se han descripto disminuciones en la GDP y en la eficiencia de conversión en bovinos alimentados con bajos niveles de Zn, sin que se produzca una disminución en dicho indicador (Engle y col., 1997).

Dentro de la producción de carne existen, al menos, dos etapas claras que debe atravesar el ternero hasta llegar al peso de faena. La primera de ellas, la etapa de cría, se extiende desde su nacimiento hasta el destete. La segunda etapa, llamada invernada o de engorde, se desarrolla desde el destete hasta el momento de la faena. Si bien entre estas dos etapas puede haber un período de recría, este no siempre se lleva a cabo. Cada una de estas etapas presentan características particulares, siendo la etapa de cría generalmente de

carácter extensivo, mientras que la etapa de engorde se realiza en casi el 30% de los terneros de la provincia de Bs. As. con los animales confinados en corrales (Ministerio de Agroindustria, 2015).

La CDRS es una extensa área en la cual la actividad ganadera principal es la cría. Esta región produce un stock anual de terneros cercano a los 2 millones, para lo cual se utiliza al pastizal natural como base de la alimentación (Némoz, 2013), y donde se han reportado antecedentes de pastizales deficientes de Zn (Ramirez y col., 1998).

El ingreso al sistema de engorde a corral es una situación estresante para los animales, lo cual sumado al cambio de dieta y tipo de alimentación conduce a una disminución en el consumo de alimento (Noffsinger y col., 2015). Esta reducción en el consumo puede llevar a que los animales no cubran sus requerimientos minerales, entre ellos el de Zn. Además, esta condición de riesgo podría verse potenciada en aquellos animales que provienen de zonas con bajos niveles de Zn en el forraje. En estos animales el riesgo de presentar deficiencia se vería aumentado con la consiguiente disminución en la GDP. La ingesta de forraje deficiente de Zn o la disminución de la ingesta en general al comienzo de la etapa de engorde podrían disminuir la performance productiva de los terneros, condición que podría evitarse con la suplementación parenteral con el mineral (Genther-Schroeder y Hansen, 2015; Mattioli y col., 2018).

La hipótesis del presente trabajo es que la suplementación parenteral con Zn en terneros de cría al pie de la madre, y en terneros que ingresan a un sistema de engorde a corral aumenta la GDP. Por lo tanto, los objetivos fueron evaluar el efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre la GDP en terneros de un establecimiento de cría ubicado en la CDRS (objetivo 1) y en terneros que ingresan a un sistema de engorde a corral, provenientes de un partido de la CDRS (objetivo 2).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos realizados en el presente trabajo fueron aprobados bajo el Protocolo para el Uso de Animales de Investigación Científica (Identificación interna Nº 51-5-15T) del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata.

3.2.1 Animales y diseño experimental utilizados para el objetivo 1 (terneros durante la etapa de cría)

El trabajo se realizó en un establecimiento ganadero comercial dedicado a la cría bovina ubicado en el partido de Chascomús, provincia de Bs. As. (35° 44′ 31" S 58° 06′ 11" O). Se utilizaron 48 terneros Aberdeen Angus al pie de la madre (21 hembras, 8 machos enteros, 19 machos castrados) cuyo peso promedio fue de 119,4 ± 18,5 kg y 103,5 ± 15,3 días de vida. Previo al inicio del experimento, los terneros recibieron una dosis de vacuna clostridial (Policlostrigen®, Biogénesis-Bagó S.A) y fueron desparasitados con ricobendazol (Paraxane®, Biogénesis-Bagó S.A). Durante todo el experimento se realizó el seguimiento de la carga de parásitos gastrointestinales por examen coproparasitológico.

Los terneros estuvieron siempre al pie de la madre sobre parcelas de pastizales naturales y naturalizadas (*Chaetotropis elonga, Stenotaphrum secundatum, Paspalum dilatatum, Lolium perenne, Lotus tenuis*). La concentración de Zn del forraje, considerando la topografía del terreno, fue evaluada por muestras tomadas al inicio (día 0) y en el día 59 del ensayo. El procesamiento y medición de las muestras se hicieron según lo descripto en el capítulo 2, apartado 2.2.3.

Los animales incluidos en el experimento fueron divididos en dos grupos homogeneos (respetando sexo y castración). Un grupo recibió por vía subcutánea 1 mg Zn/kg de peso vivo (como sal de edetato; grupo Zn), mientras que el otro grupo recibió, también por vía subcutánea, 3 mL de solución fisiológica estéril (grupo Control). La

suplementación se realizó el día del inicio del experimento (día 0), y los días 28, 59 y 90 posteriores al inicio.

Los animales fueron sangrados por punción yugular y pesados individualmente con balanza electrónica el día del inicio del experimento (día 0), y los días 28, 59, 90 y 119 posteriores al inicio.

3.2.2 Animales y diseño experimental utilizados para el objetivo 2 (terneros que ingresan a un sistema de engorde a corral)

El trabajo se llevó a cabo en un establecimiento ganadero comercial dedicado al engorde a corral ubicado en el partido de Marcos Paz, provincia de Bs. As (34° 08' S, 58° 08' O). Se utilizaron 60 terneros Aberdeen Angus destetados de manera precoz (12 hembras, 48 machos), provenientes de Dolores, Bs As, con un peso de 81,9 ± 9,7 kg. Al momento del arribo, los animales fueron alojados en un corral de recepción con rollo de pastura y agua *ad libitum*. A las 72 h del arribo se les realizó un plan sanitario que incluyó un tratamiento metafiláctico con antibiótico (tilmicosina- Maxitil®, Biogénesis-Bagó S.A), una dosis de vacuna clostridial (Policlostrigen®, Biogénesis-Bagó S.A) y desparasitación con ricobendazol (Paraxane®, Biogénesis-Bagó S.A).

Los animales fueron alojados en un mismo corral con disponibilidad de agua *ad libitum* y recibieron dos veces al día una dieta compuesta por 49% de grano de maíz, 19,5% de silo de maíz, 19,5% de harina de soja, 9,5% de gluten feed y 2,5% de una premezcla de vitaminas y minerales que aportaba la totalidad de los requerimientos en vitaminas y minerales para la categoría determinado por NRC, 2016.

Los animales incluidos en el ensayo fueron divididos en dos grupos homogéneos con respecto al peso y el sexo. Un grupo recibió por vía subcutánea 1 mg Zn/kg de peso vivo (como sal de edetato; grupo Zn), mientras que el otro grupo recibió, también por vía subcutánea, 3 mL de solución fisiológica estéril (grupo Control). La suplementación se realizó el día del inicio del experimento (día 0) y el día 7 posterior al mismo.

Los animales fueron sangrados por punción yugular el día 0, 7 y 21, y pesados individualmente con balanza electrónica el día 0 y 21.

3.2.3 Recolección de muestras de sangre y determinación de Zn

Para evaluar la concentración de Zn en el plasma sanguíneo se utilizaron tubos plásticos, previamente lavados con HCl, con heparina sódica como anticoagulante. Una vez obtenidas, las muestras se refrigeraron inmediatamente después de la extracción a 4°C. Dentro de las 3 h posteriores a la extracción las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos y el plasma obtenido fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento. El plasma fue desproteinizado con ácido tricloracético al 10% (p/v), luego centrifugado a 5000 rpm durante 10 min para obtener el sobrenadante, sobre el cual se determinó la concentración de Zn por espectrofotometría de absorción atómica de llama (A. Analyst 200 – Perkin Elmer).

3.2.4 Análisis estadístico

Para explicar la variación de la GDP, el peso y la zincemia del objetivo 1, se ajustaron tres modelos de regresión lineal con medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento GLIMMIX de SAS 9.4 (SAS Inst. Inc.). Las variables explicativas ofrecidas a los modelos fueron el tratamiento asignado (Zn vs Control), los muestreos (0, 28, 59, 90 y 119 días), sexo (hembra, macho castrado y macho entero) y la interacción (tratamiento * muestreo). La selección de los modelos finales fue realizada con un método eliminación de variables hacia atrás. Se consideró significativo un valor de $P \leq 0,05$ y se consideraron tendencias valores de $P \leq 0,1$. Para tener en cuenta la correlación entre mediciones de un mismo individuo se especificó una estructura de correlación autorregresiva de primer orden. Los resultados se expresan como medias de los mínimos cuadrados.

En cuanto al objetivo 2, para evaluar la variabilidad en la GDP se ajustó un modelo de regresión lineal simple, con el efecto de tratamiento como único predictor fijo. La variabilidad en el peso y la zincemia se explicó a partir de dos modelos de regresión

lineal con medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento GLIMMIX de SAS 9.4 (SAS 9.4, Inst. Inc.). Las variables explicativas ofrecidas al modelo fueron el tratamiento asignado (Zn vs Control), el muestreo (0 y 21 días para el modelo de peso; 0, 7 y 21 días para el modelo de zincemia), el sexo (macho castrado y hembra) y la interacción tratamiento * muestreo. La selección del modelo final fue realizada con un método eliminación de variables hacia atrás. Se consideró significativo un valor de $P \leq 0,05$ y se consideraron tendencias valores de $P \leq 0,1$. Se definió una estructura de correlación autorregresiva de primer orden para tener en cuenta la correlación entre observaciones de un mismo animal (Proc GLIMMIX, SAS 9.4). Los resultados se expresan como medias de los mínimos cuadrados.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre la GDP de terneros al pie de la madre.

Los niveles de Zn en las muestras de forraje fueron de 24,6 y 30,3 mg/Kg de MS para la media loma y el bajo del potrero al inicio del experimento, y de 15 y 29,2 mg/Kg de MS para las mismas zonas en el día 59 del experimento.

La GDP, el peso y la zincemia no se vieron afectadas por la suplementación con Zn ($P > 0,25$), ni por el sexo ($P > 0,14$). Por otro lado, en estas tres variables evaluadas hubo efecto del muestreo ($P < 0,01$), no existiendo interacción entre el tratamiento y el muestreo ($P > 0,35$). Los resultados se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Efecto de la suplementación parenteral con Zn en la GDP, el peso y la zincemia de terneros al pie de la madre.

Variable	Grupo		EEM	Valor de P		
	Control	Zinc		Tratamiento	Muestreo	Tratamiento * muestreo
GDP (kg/día)						
Día 0 a 28	0,695	0,694				
Día 29 a 59	0,638	0,655	0,039	0,25	<0,01	0,35
Día 60 a 90	0,586	0,563				
Día 91 a 119	0,808	0,695				
Peso (kg)						
Día 0	119,2	119,6				
Día 28	138,7	139				
Día 59	158,4	159,3	4,1	0,95	<0,01	0,35
Día 90	176,7	176,8				
Día 119	200,2	196,9				
Zincemia (µg/dL)						
Día 0	126,3	116,1				
Día 28	110,9	106,4				
Día 59	113,2	108,8	5	0,41	<0,01	0,69
Día 90	118,2	121,3				
Día 119	99	100,7				

Grupo: Los animales del grupo Zn recibieron por vía subcutánea 1 mg de zinc por kg de peso vivo los días 0, 28, 59 y 90. Los animales del grupo Control recibieron 3 mL de solución fisiológica estéril. Todos los animales fueron pesados y se les extrajo una muestra de sangre los días 0, 28, 59, 90 y 119.
EEM: Error estándar de la media.
GDP: Ganancia diaria de peso.

3.3.2 Efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre la GDP de terneros durante el período de adaptación a un sistema de engorde a corral.

La GDP no se vio afectada por la suplementación con Zn ni por el sexo de los terneros durante el período de adaptación al sistema de engorde a corral (P > 0,26). El peso y la zincemia tampoco se vieron afectados por la suplementación con el mineral ni por el sexo de los animales (P > 0,52). Por otro lado, el día del muestreo presentó un efecto sobre el peso y la zincemia. Esta última fue menor en el día 0 con respecto a los días 7 y 21 (112,8 ± 4,2; 126,5 ± 4,2; 130,6 ± 4,5 µg/dl de Zn, respectivamente; P = 0,01). No existió interacción entre muestreo y tratamiento para las variables peso y zincemia (P = 0,43 y 0,34, respectivamente). Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Efecto de la suplementación parenteral con Zn en la GDP, el peso y la zincemia de terneros en el período de adaptación al sistema de engorde a corral.

Variable	Grupo		EEM	Valor de P		
	Control	Zinc		Tratamiento	Muestreo	Tratamiento * muestreo
GDP (kg/día)	0,782	0,862	0,05	0,26	-	-
Peso (kg)						
Día 0	81,3	82,5	1,97	0,52	<0,01	0,43
Día 21	97,7	99,9				
Zincemia (µg/dL)						
Día 0	109,8	115,8				
Día 7	132	121	6,7	0,58	0,01	0,34
Día 21	132,4	128,8				

Grupo: Los animales del grupo Zn recibieron por vía subcutánea 1 mg de zinc por kg de peso vivo los días 0 y 7. Los animales del grupo Control recibieron un volumen igual de solución fisiológica. Todos los animales fueron pesados el día 0 y 21, y se les extrajo una muestra de sangre los días 0, 7 y 21.

GDP: Ganancia diaria de peso.
EEM: Error estándar de la media.

3.4 DISCUSIÓN

Las muestras de forraje obtenidas durante el desarrollo del experimento de cría contenían concentraciones de Zn por debajo de lo recomendado (especialmente en la media loma; NRC, 2016). A pesar de que los animales se encontraban bajo el riesgo potencial de sufrir dicha deficiencia, la suplementación parenteral con Zn no tuvo efecto sobre la GDP ni en el peso de los terneros (P = 0,25 y P = 0,95, respectivamente). Estos resultados se encuentran en disonancia con los obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo, donde la suplementación parenteral con Zn, cada 40 días, aumentó la GDP en la etapa de cría (Mattioli y col., 2019b). Esta diferencia podría deberse a que los animales utilizados en ambos trabajos presentaron un estatus inicial de Zn diferente entre sí. Si bien, la concentración de Zn en el forraje fue baja, los terneros utilizados en el presente ensayo mostraron concentraciones normales de Zn en plasma (>90µg/dL), mientras que en aquellos utilizados por Mattioli y col. (2019b) los valores se encontraban en el rango de deficiencia marginal (entre 80 y 90 µg/dL).

Existen múltiples trabajos donde se evalúa el efecto de la suplementación con Zn durante el engorde a corral, sin embargo, en la totalidad de ellos se emplea exclusivamente la vía oral, presentando resultados muy variados. De estos trabajos se desprende que, en líneas generales, cuando el Zn se suplementa por encima de 30 mg/kg de MS, no se observan efectos sobre el peso o la GDP (Malcolm-Callis y col., 2000; Kessler y col., 2003; Wright y Spears, 2004; Montano y col., 2017; Genther-Schroeder y col., 2018; Budde y col., 2019). Sin embargo, en ocasiones, la suplementación por encima del valor mencionado produce una mejoría en la eficiencia de conversión alimenticia (Nunnery y col., 2007; Vanbibber-Krueger y col., 2018). Spears y Keagly (2002) observaron una mayor GDP en terneros suplementados con 25 mg de Zn/kg de MS sobre una dieta basal que aportaba 33 mg de Zn/kg de MS solo en la etapa de crecimiento (86

días); no observando efecto en la etapa de terminación (84 días) donde se suplementó con el mismo nivel de Zn a un alimento que contenia 26 mg de Zn/kg de MS. En corderos, la suplementación oral de Zn incrementó la GDP y la eficiencia de conversión en animales que consumían un alimento con bajos niveles del mineral (<30 mg/kg de MS) (Spears, 1989; Alimohamady y col., 2019). Además, Engle y col., (1997) observaron una disminución en la GDP y en la eficiencia de conversión en vaquillonas alimentadas durante 21 días con una dieta pobre en Zn (17 mg de Zn/kg de MS). La falta de respuesta a la suplementación parenteral en el presente trabajo podría deberse a que el Zn aportado por la dieta resultó suficiente para cubrir las necesidades diarias del mineral. Esto quedaría evidenciado por los elevados niveles plasmáticos de Zn durante todo el ensayo (incluso en el grupo Control). Lamentablemente, no fue posible evaluar la eficiencia de conversión dado que todos los animales fueron alimentados mediante un único comedero.

De manera similar a lo observado en los terneros de cría, la suplementación con Zn no modificó la zincemia de los terneros al inicio del sistema de engorde. Este resultado se encuentra en concordancia con otros, donde la suplementación parenteral con Zn no modificó sus valores plasmáticos (Daugherty y col., 2002; Ganda y col., 2016). En un trabajo reciente realizado por Anchordoquy y col. (2019) en vacas de cría, la suplementación parenteral con Zn al inicio de un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo no incrementó la concentración plasmática del mineral. Sin embargo, Mattioli y col. (2019b) observaron que dicha suplementación en terneros de cría incrementa sus zincemias. Estas diferencias podrían deberse a que los animales utilizados en nuestros ensayos, así como los utilizados por Anchordoquy y col. presentaban valores adecuados de Zn en plasma (>90 µg/dL), mientras que los animales utilizados por Mattioli y col. iniciaron el ensayo con valores por debajo de lo considerado normal (<90 µg/dL).

En los dos experimentos realizados, la zincemia se vio afectada en función del tiempo. En el experimento realizado en terneros de cría, parte de esta variación pudo haber sido causada por cambios en la concentración de Zn del forraje, ya que el Zn

presente en el mismo evidenció variaciones durante el experimento (principalmente en la media loma). En cuanto a los resultados observados durante las primeras semanas del sistema de engorde a corral, las variaciones en las zincemias podrían deberse principalmente al estrés ocasionado por el transporte, el cambio del sitio de alojamiento, el cambio en el tipo de dieta y en la forma de alimentación, lo que produce además una disminución en el consumo de alimento (Herdt y Hoff, 2011; Noffsinger y col., 2015). El estrés causa una redistribución de Zn en el organismo, lo que lleva al hígado a captar mayor cantidad de Zn plasmático reduciendo su presencia en sangre (Tian y col., 2014). La disminución del consumo de alimento y la redistribución orgánica del Zn al momento del arribo al sitio del engorde, podrían explicar por qué se registraron los valores más bajos de zincemia al inicio del ensayo (día 0).

3.5 CONCLUSIÓN

La suplementación parenteral con Zn (1 mg/kg de peso vivo) no incrementa la GDP en aquellos animales que presentan zincemias normales durante el período de cría o al inicio del sistema de engorde a corral.

CAPÍTULO 4

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PARENTERAL CON ZINC EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ DE HEMBRAS BOVINAS ADULTAS

4.1 INTRODUCCIÓN

El Zn está involucrado en una gran cantidad de procesos biológicos, como la proliferación celular, función inmune y defensa contra radicales libres (McCall y col., 2000; Powell, 2000; Cousins y col., 2006; Sheikh y col., 2017). También, se lo menciona al Zn, como un factor clave en la reproducción debido a que su deficiencia (leve o severa) produce el desarrollo anormal del ovario, altera el ciclo estral y retrasa el crecimiento folicular en ratones, mujeres y monos (Taneja y Kaur, 1990; Bedwal y Bahuguna, 1994; Zhang y col., 1998). Además, se sugiere que la deficiencia de Zn podría causar la pérdida de la gestación en mujeres, monos, roedores y ovejas (Graham y col., 1994). Sin embargo, si bien existen numerosos estudios acerca de la relación entre el estatus de Zn de la madre y el éxito de la preñez, muchos de los mismos presentan resultados contradictorios (Bedwal y Bahuguna, 1994, Kynast y Saling, 1980; Apgar, 1985; Apgar, 1992; Simmer y Thompson, 1985; Villa Elizaga y da Cunha Ferreira, 1985; Swanson y King, 1987; Campbell, 1988; Valdes-Ramos, 1992; Tamura y Goldenberg, 1996; Swain y col., 2016). Por lo tanto, el rol del Zn en la función reproductiva de la hembra bovina aún no ha sido bien caracterizado.

La hipótesis del presente trabajo es que la suplementación con Zn aumenta la performance reproductiva de la hembra bovina incrementando la tasa de preñez. Para corroborar dicha hipótesis se realizó un estudio con el fin de evaluar el efecto de la suplementación parenteral con Zn al inicio de un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) sobre el área del folículo preovulatorio (FP) y del cuerpo lúteo (CL),

la concentración plasmática de estradiol (E2) y progesterona (P4), y el porcentaje de preñez.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos realizados en el presente ensayo fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata (Protocolo Nº 78-2-18P).

4.2.1 Locación y animales de experimentación

El presente ensayo se realizó en dos establecimientos ganaderos comerciales localizados en la Provincia de Buenos Aires (establecimiento 1: 35º 21´ 48" S, 57º 13´ 37" O; y establecimiento 2: 34º 56´ 29" S, 59º 08´23" O) en la primavera (octubre-noviembre) del año 2017.

Se utilizó un total de 62 vacas Aberdeen Angus adultas. En el establecimiento 1 se incluyeron 27 animales con un peso promedio de 456,1 ± 4,7 kg, una condición corporal (CC) de 3,32 ± 0,02 (rango, 2,5-4) en una escala de 1-5 (Houghton y col., 1990) y más de 62 días posparto al inicio del ensayo. En el establecimiento 2 se utilizaron 35 vacas con un peso promedio de 476,1 ± 6,2 kg, con una CC de 3,57 ± 0,03 (rango 2,5-4) y más de 65 días posparto al inicio del ensayo. Las vacas de ambos establecimientos se encontraban bajo un sistema de manejo extensivo basado en pastoreo de pastizal natural.

4.2.2 Protocolo de IATF

A todas las vacas incluidas en el presente ensayo se les realizó un protocolo convencional de IATF. Brevemente, el día 0 del ensayo, recibieron una inyección intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Syntex, Argentina) y un dispositivo intravaginal que contenía 0,5 g de P4 (DIB®, Syntex, Argentina). El día 7 se retiraron los dispositivos intravaginales, y todos los animales recibieron una dosis de un análogo de la prostaglandina F2α (500 μg D+cloprostenol; Ciclase®, Syntex) y 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn®, Syntex) ambos por vía IM. Las vacas fueron inseminadas

artificialmente, 52-56 h posteriores al retiro del dispositivo intravaginal, por un único operario (día 9). En ambos establecimientos se utilizó semen del mismo toro que pertenecía a una misma partida.

4.2.3 Grupos experimentales

En cada establecimiento, las vacas fueron divididas al azar en dos grupos. El grupo Zn, recibió una única inyección de sulfato de Zn (400 mg totales en 8 mL; Sigma-Aldrich, Cat. No. 83265) por vía subcutánea el día 0 del ensayo. El grupo control recibió un volumen equivalente (8 mL) de solución fisiológica estéril por vía subcutánea en el día 0 del ensayo.

En el establecimiento 1, los grupos quedaron conformados por n=11 y n=16 para el grupo Zn y control respectivamente. En el establecimiento 2, los grupos fueron de n=16 y n=19 animales para el grupo Zn y control respectivamente.

4.2.4 Muestras de sangre

Las muestras de sangre (10 mL) se obtuvieron por punción de la vena coccígea los días 0, 7, 9 y 16. Las mismas fueron recolectadas en tubos con EDTA e inmediatamente refrigeradas con hielo. Fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para obtener el plasma. El plasma se almacenó a -20°C hasta el momento del análisis.

4.2.5 Concentración de Zn plasmático

La zincemia fue evaluada los días 0, 7, 9 y 16. Las muestras de plasma fueron proporcionalmente desproteinizadas con ácido tricloracético al 10% (p/v). Las mediciones de Zn se realizaron utilizando espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 200; AAS, International Equipment Trading Ltd., Mundelein, EE. UU.).

4.2.6 Medición de hormonas

La concentración plasmática de E2 (día 9 del protocolo) se determinó mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) utilizando un kit comercial (Estradiol Double Antibody, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA) (el

coeficiente de variación intraensayo fue de 7,6% y la sensibilidad de 2,9 pg/muestra). La concentración plasmática de P4 (día 16 del protocolo) se determinó mediante RIA con un kit comercial (Coat A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostics) (el coeficiente de variación intraensayo fue de 11.9% y la sensibilidad de 0,2 ng/muestra). En ambos casos, el momento de la evaluación se estableció de forma arbitraria, teniendo en cuenta que el día 9 es el día del protocolo en el cual el folículo dominante alcanza su tamaño máximo (de la Mata y col., 2018); y, por otro lado, considerando que alrededor del día 6 posovulación (día 16 del protocolo, aproximadamente) el CL alcanza su diámetro máximo (Tom y col., 1998).

4.2.7 Ultrasonografía

El área del FP al momento de la IATF (AFP, día 9), el área del CL (ACL, día 16) y el porcentaje de preñez (día 50, 41 días después de la IATF) se determinaron por ultrasonografía transrectal (ecógrafo Aloka 500V equipado con un transductor lineal de 7.5-MHz, Wallingford, CT). Para estimar el AFP y el ACL se tomaron imágenes del diámetro máximo horizontal y vertical de cada FP, CL y cavidad del CL, en caso de que estuviera presente. Para el análisis estadístico se tomaron ambos diámetros y se realizó un promedio. El ACL se calculó restando el área de la cavidad lútea al área total del CL. El diagnóstico de preñez se realizó por presencia del latido cardíaco fetal. Todas las mediciones fueron realizadas por el mismo operador.

4.2.8 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio en bloque. El modelo estadístico incluyó el efecto aleatorio del bloque (establecimiento, n=2), el efecto fijo del tratamiento (n=2) y la interacción de primer orden. El análisis estadístico de las variables continuas (zincemias, E2 y P4, AFP y ACL) se realizó mediante una regresión lineal con el procedimiento MIXED de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). Para el análisis estadístico de la zincemias se utilizó un modelo lineal de medidas repetidas en el mismo programa estadístico. El AFP se utilizó como covariable en el análisis del ACL. El análisis de las

variables binomiales (tasa de preñez) se realizó mediante una regresión logística con el procedimiento GLIMMIX de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). Para lo cual se utilizó una distribución Binomial y un enlace Logit. Los resultados se expresaron como medias de los mínimos cuadrados ± EEM. La significancia estadística se fijó en $P \leq 0,05$ y se consideró tendencia cuando P fue $\leq 0,1$.

4.3 RESULTADOS

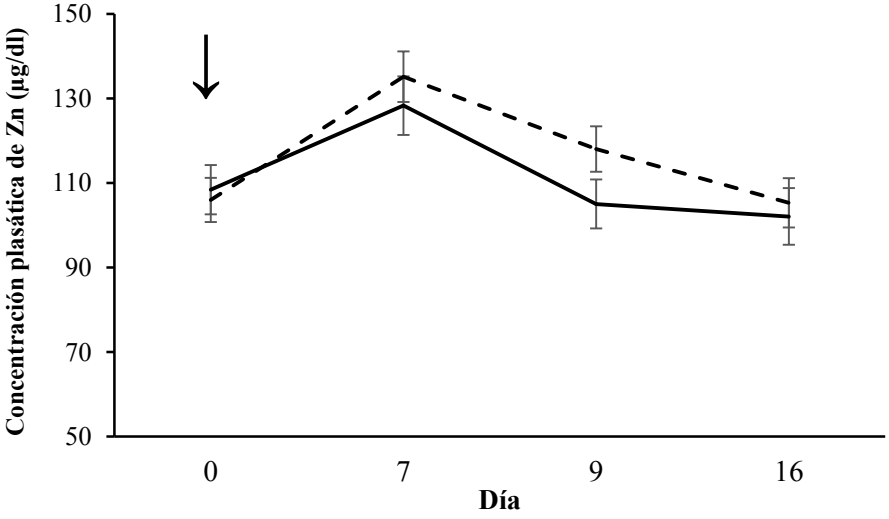
4.3.1 Animales

La concentración plasmática de Zn al inicio de la IATF (día 0) fue diferente en ambos establecimientos (91,5 ± 5,3 y 125,5 ± 4,6 µg/dl Zn para los establecimientos 1 y 2 respectivamente; $P < 0,01$). El 66,6% (18/27) de las vacas del establecimiento 1 presentaron valores de zincemia inferiores a los valores consideradados adecuados (< 90 µg/dl). En el establecimiento 2, por el contrario, todos los animales (35/35) presentaron valores normales de zincemia (> 96 µg/dl).

4.3.2 Efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre la zincemia

El tiempo (día) tuvo un efecto cuadrático sobre la zincemia (107,2 ± 3,9; 131,7 ± 4,5; 111,5 ± 3,9 y 103,7 ± 4,4 µg/dl de Zn; para los días 0, 7, 9 y 16, respectivamente; $P < 0,01$; Figura 4.1). Sin embargo, la suplementación parenteral con Zn no modificó la concentración plasmática del mineral (116,1 ± 2,9 vs. 110,9 ± 3,2 µg/dl de Zn para el grupo control y Zn, respectivamente; $P = 0,24$). La interacción del tiempo y el tratamiento no tuvo efecto sobre la concentración plasmática de Zn ($P = 0,55$).

Figura 4.1. Efecto de la suplementación parenteral con Zn al inicio de un protocolo de IATF sobre la zincemia



Las vacas fueron suplementadas al comienzo del protocolo de IATF (día 0; indicado con flecha) con solución salina (grupo control; línea discontinua) o con 400 mg de sulfato de Zn (grupo zinc; línea continua). La concentración plasmática de Zn fue evaluada los días 0, 7, 9 y 16 del ensayo. Los resultados se expresan como medias de los mínimos cuadrados ± EEM. El tiempo (día) tuvo un efecto cuadrático sobre la concentración plasmática de Zn ($P < 0,01$). No existió efecto del tratamiento (suplementación parenteral con Zn) ni de la interacción del tiempo y el tratamiento sobre la concentración plasmática de Zn ($P = 0,24$ y $P = 0,55$, respectivamente).

4.3.3 Efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre el AFP, ACL, concentración plasmática de E2 y P4 y el porcentaje de preñez.

El efecto de la suplementación parenteral con Zn sobre el AFP, ACL y la concentración plasmática de E2 y P4 se muestra en la Tabla 4.1. La suplementación con Zn aumentó el AFP ($P = 0,04$) y la concentración plasmática de P4 ($P = 0,01$), pero no modificó la concentración plasmática de E2 ni el ACL. En las hembras deficientes (zincemia < 90 µg/dl en el día 0) la suplementación con Zn aumentó el ACL (3,40 ± 0,30 vs. 4,40 ± 0,39 cm2 para el grupo control y Zn respectivamente; $P = 0,04$), tendió a incrementar el AFP (0,97 ± 0,12 vs. 1,36 ± 0,15 cm2 para el grupo control y Zn respectivamente; $P = 0,09$) e incrementó solo numéricamente la concentración plasmática de P4 (4,1 ± 0,6 vs. 5,4 ± 0,8 ng/ml para el grupo control y Zn respectivamente; P =

0,25). En estos animales, la suplementación con Zn no modificó la concentración plasmática de E2 (18,1 ± 1,4 vs. 15,7 ± 1,7 pg/ml para control y Zn, respectivamente; P = 0,31).

Finalmente, la suplementación con Zn incrementó el *odds ratio* (OR) de preñez (OR = 3,98; P = 0,04) dado que el porcentaje de preñez fue de 80,9% en las vacas suplementadas con Zn vs. 51,6% en las vacas control (Tabla 4.2). La interacción entre los establecimientos y la suplementación con Zn no tuvo efecto sobre ninguna de las variables analizadas (P > 0,30).

Tabla 4.1. Efecto de la suplementación parenteral con Zn al inicio de un protocolo de IATF sobre el área del folículo preovulatorio (AFP), área del cuerpo lúteo (ACL), y concentración plasmática de estradiol (E2) y progesterona (P4).

Tratamiento	AFP (cm^2)	E2 (pg/mL)	ACL (cm^2)	P4 (ng/mL)
Control	$0,88 \pm 0,05^a$	15,5 ± 0,7	3,35 ± 0,19	$3,7 \pm 0,3^a$
Zinc	$1,09 \pm 0,08^b$	15,8 ± 0,8	3,64 ± 0,22	$5,0 \pm 0,3^b$

Las vacas recibieron una inyección subcutánea con 400 mg de sulfato de zinc al inicio de un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo (día 0 del ensayo) o actuaron como control negativo. El AFP fue evaluado el día 9. La concentración plasmática de E2 fue evaluada al momento de la inseminación (día 9). El ACL se estimó el día 16 al igual que la concentración plasmática de P4. Los resultados se expresan como medias de los mínimos cuadrados ± EEM. Diferentes superíndices dentro de la columna indican P < 0.05.

Tabla 4.2. Efecto de la suplementación parenteral con Zn al inicio de un protocolo de IATF sobre la tasa de preñez en hembras bovinas.

			Riesgo de preñez		
		%	OR	IC 95%	P
Establecimiento	1	55,56	1		0,39
	2	67,65	1,67	0,50–5,58	
Zn	No	51,61	1		0,04
	Si	80,95	3,98	1,05–15,05	

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confianza. El ensayo se realizó con animales de dos establecimientos ganaderos comerciales. Las vacas del grupo suplementado con Zn fueron inyectadas por vía subcutánea con 400 mg de sulfato de zinc al inicio de un protocolo de IATF. La tasa de preñez se determinó por ultrasonografía transrectal 41 días después de la inseminación artificial.

4.4 DISCUSIÓN

En el presente estudio, la suplementación parenteral con Zn al inicio del protocolo de IATF incrementó la tasa de preñez de hembras bovinas, independientemente del estatus inicial del mineral. La suplementación con Zn no solo aumentó el ACL en las hembras deficientes, sino que también, incrementó la concentración plasmática de P4 en vacas con valores de zincemia considerados normales (> 90 μg/dL). La concentración plasmática de P4 en animales con deficiencia de Zn se incrementó solo numéricamente, probablemente debido al escaso número de animales con esta condición.

Diversos trabajos dan cuenta de la relación existente entre el Zn y el funcionamiento del CL. En ratas, Zhang y colaboradores (1998) demostraron que el Zn inhibe la apoptosis en células luteales cultivadas *in vitro*. Además, la deficiencia de Zn en la dieta causa el desarrollo de un CL de menor tamaño en esta especie (Taneja y Kaur, 1990). Por otro lado, el Zn forma parte constitutiva de la enzima Cu/Zn-SOD, donde la unión del Zn a la Cu/Zn-SOD es esencial para su adecuada función biológica (Borchelt y

col., 1994; Sahawneh y col., 2010). Varios estudios demuestran la importante participación de esta enzima en el mantenimiento de un CL de tamaño normal y con producción adecuada de P4 (Nishimura y col., 2008; Noda y col., 2012; Al-Gubory y col., 2012; Kawaguchi y col., 2013). La enzima Cu/Zn-SOD es uno de los principales mecanismos para la defensa celular contra las especies reactivas del oxígeno (Ho, 2004), la cual protege a la célula contra el daño producido por el radical superóxido. En animales deficientes de Zn, la disminución de la actividad Cu/Zn-SOD podría dañar las células luteales, disminuir el tamaño del CL y reducir la producción de P4.

La progesterona es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la preñez. La disminución de la concentración plasmática de dicha hormona durante el desarrollo embrionario temprano reduce la secreción embrionaria de interferón-tau (IFN-t) y altera la expresión de genes asociados a la migración y proliferación celular, a la remodelación proteica, y a factores que contribuyen con la elongación embrionaria (Forde y col., 2011; Forde y col., 2012). Diferentes estudios han reportado una asociación positiva entre la concentración de P4 durante la preñez temprana y el crecimiento del concepto bovino (Mann y Lamming, 2001; Green y col., 2005). Además, se ha visto que la suplementación con P4 durante los estadíos tempranos de la preñez favorece el desarrollo embrionario y la secreción uterina (Garrett y col., 1988; Mann y col., 1995). En vacas de producción lechera, la concentración sérica de P4 se encuentra asociada a la supervivencia del embrión (McNeill y col., 2006; Stronge y col., 2005; Rhinehart y col., 2009). En ganado de leche, se demostró una asociación positiva entre la concentración sérica de P4 de hembras receptoras (en los primeros 7 días de la gestación) y la tasa de preñez obtenida por transferencia embrionaria (Kenyon y col., 2012). En ganado de carne, la reducción de P4 sérica durante la lactancia, incrementa las pérdidas embrionarias tardías y fetales tempranas (Rhinehart y col., 2009). Estos resultados confirman que la concentración plasmática de P4 es un indicador importante de supervivencia embrionaria/fetal durante la

preñez temprana. En el presente estudio, el incremento en P4 producido por la suplementación con Zn fue acompañado por un incremento en la tasa de preñez.

Si bien, la literatura acerca del efecto de la suplementación con Zn sobre el porcentaje de preñez en el bovino es escasa, existen varios estudios donde se ha evaluado el efecto de la suplementación con mezclas minerales conteniendo Zn sobre dicha variable (Olson y col., 1999; Ahola y col., 2004; Black y French, 2004; Vanegas y col., 2004; Siciliano-Jones y col., 2008; González-Maldonado y col., 2017). Ahola y col., (2004) observaron un incremento en la tasa de preñez post-IA en vacas suplementadas oralmente por dos años con Zn, Cu y manganeso (Mn). Además, en un metaanálisis donde se evaluaron 20 artículos y reportes de investigación, Rabiee y col., (2010) demostraron que la suplementación oral con una mezcla de sales orgánicas de Zn, Cu, Mn y cobalto redujo el número de servicios por concepción e incrementó el porcentaje de preñez en vacas lecheras en lactancia.

En el presente estudio, la suplementación con Zn al inicio del protocolo de IATF incrementó el AFP. Este hallazgo se encuentra en concordancia con otros autores (Swenerton y Hurley 1980, Taneja y Kaur 1990), donde la deficiencia de Zn provocó el retraso del crecimiento folicular y la falta de folículo preovulatorio de Graaf en monos y ratones. Además, Ceko y col. (2015), estudiando la distribución del Zn en el ovario bovino, encontraron que dicho mineral se halla en concentraciones más elevadas en folículos sanos respecto a los atrésicos, remarcando la importancia del Zn en el metabolismo folicular (la cohorte sana mostró tres veces más Zn que los folículos en regresión). Si bien, el efecto directo del Zn sobre los folículos y el CL podría ser el responsable del aumento en el AFP, ACL (solo en vacas deficientes) y la P4 en los animales suplementados (Zhang y col., 1998; Ceko y col., 2015), estos cambios podrían deberse también, a la participación del Zn en la síntesis y/o secreción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (Bedwal y Bahuguna, 1994). La FSH es la principal hormona reguladora del crecimiento folicular durante su inicio (McNeilly y

Fraser, 1987). La LH, por otro lado, estimula el crecimiento final del folículo, y en el bovino, el crecimiento del CL y la secreción de P4 por parte del mismo (Snook y col., 1969; McNeilly y Fraser, 1987; Weems y col., 1998; Kumar y Sait, 2011).

La suplementación con Zn no produjo un aumento en su concentración plasmática, ni siquiera en los animales deficientes. Lo mismo fue descripto por González-Maldonado y col. (2017) en vacas suplementadas parenteralmente con una mezcla mineral que incluía Zn. Dichos autores especularon que el mineral podría ser absorbido y almacenado rápidamente en diferentes tejidos (músculo, adiposo e intestino delgado). En el presente estudio, la concentración plasmática de Zn aumentó únicamente en el día 7 y en ambos grupos. El incremento observado en el grupo control confirma cuan variable puede resultar la zincemia. Este incremento podría deberse al protocolo de IATF, en el cual se administra un conjunto de hormonas. Ciertas hormonas esteroideas (exógenas y endógenas) como los corticoesteroides adrenales y esteroides gonadales, pueden modificar la concentración del Zn circulante (Solomons, 1979). En la mujer, la concentración del Zn plasmático varía a lo largo del ciclo menstrual, siendo máxima durante la fase folicular para declinar durante la ovulación y la fase luteal (Deuster y col. 1987).

4.5 CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la suplementación parenteral con Zn, al inicio de un protocolo de IATF, incrementa el tamaño del folículo preovulatorio, la concentración plasmática de P4 y el porcentaje de preñez en vacas de cría sin modificar la zincemia.

CAPÍTULO 5

EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ZINC SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN BOVINOS

5.1 INTRODUCCIÓN

La deficiencia de Zn provoca alteraciones reproductivas como baja fertilidad, aumento en el período postparto e incremento en el número de servicios por concepción en diferentes especies (Swenerton y Hurley, 1980; Taneja y Kaur, 1990; Underwood y Suttle, 1999; Ceko y col., 2015). Sin embargo, poco se sabe acerca de la participación del Zn y su efecto en la reproducción de la hembra bovina. En los mamíferos, la fecundación y las primeras divisiones celulares del nuevo embrión ocurren en el oviducto. Si bien, el estudio de los componentes del fluido oviductal bovino comenzó en la década de 1950 (Olds y Vandemark, 1957), aún se desconoce la concentración de Zn en dicho líquido. Se ha demostrado previamente que la concentración de otro mineral traza, como el cobre, se encuentra dentro del rango plasmático (Anchordoquy y col., 2017). Recientemente, se ha reportado en camellos que las concentraciones de Zn en el suero y fluido oviductal son similares (Swelum y col., 2020). La composición del fluido oviductal es importante para la maduración espermática, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Grippo y col., 1992; Gardner y col., 1994; Bavister, 2000). El Zn cumple funciones importantes en la fisiología espermática dado que incrementa su viabilidad, participa en el metabolismo de lípidos y en la estabilización de la membrana y de la estructura del ADN del espermatozoide, entre otros (Fallah y col., 2018). Además, se ha propuesto al Zn extracellular como un importante regulador de la capacitación espermática y de la reacción acrosómica (RA) (Michailov y col., 2014). En ratas, la deficiencia de Zn en la dieta produce una rápida disminución en la concentración de Zn en fluidos dentro del tracto reproductivo de la hembra (Gallaher y Hurley, 1980). Por lo tanto, la presencia de

bajas concentraciones de Zn en el oviducto de hembras deficientes podría alterar la viabilidad y la función espermática, y por ende reducir la tasa de fecundación. Por otro lado, se ha demostrado que la adición de Zn al medio de cultivo, en concentraciones similares a las plasmáticas, mejora la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos (Picco y col., 2010; Anchordoquy y col., 2014). Sin embargo, no existen reportes que describan si dicha suplementación al medio de FIV afecta la calidad espermática y el desarrollo embrionario temprano en bovinos.

La hipótesis del presente trabajo es que la suplementación con Zn en el medio de fertilización *in vitro* (FIV) incrementa la calidad espermática y el desarrollo embrionario posterior en el bovino. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación al medio de cultivo con concentraciones deficientes o adecuadas de Zn sobre la calidad espermática y el éxito de la FIV.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Reactivos y medios

Todos los reactivos utilizados para la preparación de los medios fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a menos que se indique lo contrario. El medio de maduración utilizado fue TCM-199, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 0,2 mM de piruvato sódico, 1 mM de glutamina, 1 µg/mL de FSH (Bioniche Animal Health Canada Inc.), 1 µg/mL de 17b- estradiol y 50 µg/mL de kanamicina. Para la FIV se utilizó el medio Tiroides-albúmina-lactato-piruvato (TALP) suplementado con 6 mg/mL de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, 20 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina y 100 µg/mL de heparina sulfato. El medio de cultivo utilizado para el desarrollo de embriones fue el fluido oviductal sintético modificado (SOFM) (Gardner y col., 1994). La solución acuosa de sulfato de Zn utilizada fue adquirida en Merck (Tokio, Japón).

En todos los experimentos el medio de FIV fue suplementado con 0 (sin suplementación), 40, 80 y 120 µg/dL de Zn. Las concentraciones se establecieron de acuerdo a la clasificación del estatus plasmático de Zn en los bovinos; donde una concentración menor a 80 µg/dL Zn corresponde a un estatus de deficiencia, entre 80 a 90 µg/dL Zn al estatus de deficiencia marginal, y valores por encima de 90 µg/dL Zn corresponde a un estatus adecuado (Enjalbert y col., 2006).

5.2.2 Análisis de la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática del espermatozoide y de la motilidad espermática

Para la realización de todos los experimentos se utilizó un *pool* a partir de tres pajuelas de semen congelado proveniente de tres toros, adquiridas en Cabaña La Legua SA, Coronel Pringles. Los espermatozoides obtenidos se lavaron en un gradiente discontinuo de Percoll. El pellet obtenido fue removido y resuspendido en 300 µL de solución HEPES-TALP y centrifugado a 300 g por 10 minutos. El pellet resultante fue dividido en cuatro fracciones y cada una de estas fue suspendida en medio FIV suplementado con 0, 40, 80 y 120 µg/dL de Zn para alcanzar una concentración final de 2 x 10^6 espermatozoides/mL. Se tomó una alícuota de cada grupo en tres momentos diferentes (0, 3 y 6 h) para determinar la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, y su motilidad. La integridad estructural de la membrana plasmática (viabilidad espermática) se determinó utilizando la tinción eosina-nigrosina (Maes y col., 2011). Brevemente, se tomó 20 µL de la muestra de semen, se mezcló con igual volumen de la solución de eosina-nigrosina y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se tomaron 10 µL de la mezcla para realizar un frotis en portaobjeto, el cual se dejó secar al aire. Se realizó un recuento de 200 espermatozoides, a 400 x, distribuidos en al menos cinco campos microscópicos por cada réplica y se registró el porcentaje de espermatozoides vivos. Los espermatozoides no coloreados fueron clasificados como vivos, mientras que los teñidos de color rosa fueron clasificados como muertos. La integridad funcional de la membrana plasmática se evaluó usando la prueba

de hinchazón hipoosmótica (HOST, por sus siglas en inglés) (Revell y Mrode, 1994). Brevemente, se hizo una dilución 1:10 (v/v) de muestras de semen en la solución hiposmótica (100 mOsm/L; 57,6 mM de fructosa y 19,2 mM de citrato de sodio) y se incubó a 37°C por 40 min. Luego se tomó 10 µL de la muestra y se colocó entre porta y cubreobjetos. Se realizó el recuento de 200 espermatozoides, a 400x, distribuidos en al menos cinco campos microscópicos diferentes por réplica y se registró el porcentaje de espermatozoides con el flagelo hinchado y enrollado. Además, se evaluó la motilidad progresiva (MP) (al menos 200 espermatozoides en cinco campos diferentes) por medio de un análisis espermático asistido por computadora (Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA). Para cada prueba se realizaron tres réplicas.

5.2.3 Evaluación del estatus acrosomal

El estatus acrosomal (EA) se evaluó utilizando la lectina *Pisum sativum* aglutinina marcada con isotiocianato de flureseína (FITC-PSA, por sus siglas en inglés), según lo descripto por Mendoza y col. (1992). Brevemente, se realizaron frotis de semen los cuales se dejaron secar al aire por 2 h. Luego se fijaron con metanol por 30 segundos y fueron marcados utilizando 50 mg/mL de FITC-PSA en PBS por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y cuidadosamente montados. Se observaron 200 espermatozoides por muestra con un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX40, Tokyo, Japón) utilizando ondas de excitación de 450-490 nm con un aumento de 1000x. La prueba se interpretó como positiva, cuando la región acrosomal se tiñó de verde (FITC-PSA positiva; acrosoma intacto), mientras que aquellos espermatozoides que habían sufrido reacción acrosómica o daño acrosomal tuvieron solamente una banda de tinción ecuatorial con ausencia o leve tinción en la región anterior de la cabeza (FITC-PSA negativa). Para esta prueba se realizaron tres réplicas.

5.2.4 Maduración, fertilización y cultivo *in vitro*

La MIV, FIV y el CIV se realizaron según Picco y col. (2010). Brevemente, los ovarios bovinos fueron obtenidos a partir de hembras de frigorífico, independientemente del estado del ciclo estral, y transportados al laboratorio en solución fisiológica estéril con antibióticos, a 37 °C, dentro de las 3 horas de realizada la extracción. Los complejos ovocito-cúmulus (COC) fueron aspirados de folículos entre 3 a 8 mm de diámetro, utilizando una aguja (18-G) y jeringa estéril. Solo aquellos complejos con cúmulus intactos y citoplasma con granulado uniforme se seleccionaron para la MIV. Grupos de 10 COC fueron transferidos a gotas de 50 µL de medio MIV bajo aceite mineral (Squibb, Princeton, NJ, USA) e incubados por 24 h a 39°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y humedad a saturación. Para la FIV, los ovocitos fueron lavados dos veces en HEPES-TALP suplementado con 3 mg/mL de albúmina sérica bovina y colocados posteriormente en gotas de 50 µL de medio FIV bajo aceite mineral. El semen se preparó de la manera descripta en el apartado 5.2.2. El pellet de semen fue dividido en cuatro fracciones y cada una de estas fue suspendida en medio FIV suplementado con 0, 40, 80 y 120 µg/dL para alcanzar una concentración final en la FIV de 1 x 10^6 espermatozoides/mL. La incubación se realizó durante 24 h a 39°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y humedad a saturación. Después de la FIV, los presuntos zigotos fueron denudados de la células del cúmulus por medio de pipeteo, lavados dos veces en medio HEPES-TALP, y luego cultivados en SOFM. El cultivo de los embriones se llevó a cabo en gotas de 40 µL de medio bajo aceite mineral (10 presuntos zigotos por gota) a 39°C en una atmósfera de 7% de O_2, 5% de CO_2 y 88% de N_2 con aire saturado de humedad. El medio se reemplazó cada 48 h y los embriones fueron cultivados por 10 días (considerando al día 0 como el día de la fecundación). La tasa de clivaje y de blastocistos se determinó en el día 2 y 8, respectivamente. Al día 10 se registró la tasa de eclosión. Para evaluar el efecto de la suplementación con Zn durante la FIV se utilizaron seis réplicas con un total de 806 COC madurados.

5.2.5 Prueba de unión de espermatozoides a la zona pelúcida (ZP)

Los COC fueron madurados por 24 h como se describió en el apartado anterior, y luego denudados mediante pipeteo. Los ovocitos desnudos se lavaron dos veces en medio HEPES-TALP y se colocaron en gotas de 50 µL de medio FIV con las diferentes concentraciones de Zn bajo aceite mineral. Los ovocitos (10 ovocitos por gota) y los espermatozoides se incubaron por 2 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2. El semen se preparó como se explicó en el apartado 5.2.2. Después de la incubación, los ovocitos fueron transferidos a PBS suplementado con 10% (v/v) de SFB y lavados tres veces para remover los espermatozoides unidos débilmente utilizando una micropipeta. Por último, los ovocitos se tiñeron con Hoechst 33342 y fueron montados sobre portaobjetos y cubreobjetos. El número de espermatozoides unidos a cada ovocito fue determinado por observación bajo un microscopio de epifluorescencia a 200x de aumento. Para este propósito se utilizaron n=73 COC en tres réplicas.

5.2.6 Formación de pronúcleos

Los COC fueron madurados y luego fecundados *in vitro* como se describió en la sección 5.2.4. El medio de FIV se suplementó con las cuatro concentraciones de Zn. A las 18 h post inseminación, los presuntos zigotos fueron incubados por 5 minutos a 37°C en PBS con 0,1% (p/v) de hialuronidasa y luego fueron denudados mediante pipeteo. Posteriormente, los presuntos zigotos se incubaron por 30 minutos a 37°C en PBS con 5 mg/L de Hoechst 33342. Por último, se examinó la morfología pronuclear de los presuntos zigotos bajo un microscopio de epiluorescencia a 200x y 400x aumentos. Para este propósito se maduraron n=514 COC en seis réplicas.

5.2.7 Concentración de zinc en el medio de FIV

Se tomaron muestras del medio de FIV previo a la suplementación. Las mismas fueron desproteinizadas en cantidades iguales (50:50) con ácido tricloracético al 10% (p/v). La concentración de Zn se determinó usando un espectrofotómetro de absorción

atómica de llama (Perkin Elmer AAnalyst 200; AAS, International Equipment Trading Ltd., Mundelein, USA) (Piper y Higgins, 1967).

5.2.8 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio en bloque. El modelo estadístico incluyó el efecto aleatorio del bloque (réplica) y el efecto fijo del tratamiento (0 vs 40 vs 80 vs 120 μg de Zn/dL). Las variables como la concentración de Zn y el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida fueron analizadas con un modelo lineal usando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). La viabilidad, HOST, MP, EA, la formación de pronúcleos, así como los porcentajes de clivaje, blastocistos y eclosión se analizaron con una regresión logística utilizando el procedimiento GENMOD (SAS Institute, Cary, NC, USA). Los resultados se expresan como media de los mínimos cuadrados ± error estándar de la media para las variables continuas y como porcentajes en el caso de las variables discretas. Se consideró significativo un valor de $P \leq 0,05$ y se consideraron tendencias valores de $P \leq 0,1$.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Determinación de Zn en el medio de FIV

La concentración de Zn en el medio de FIV fue de 25 ± 4 μg/dL. Por lo tanto, luego de la adición de 0, 40, 80 y 120 μg/dL Zn al medio de FIV, la concentración final fue de 25 (deficiente), 65 (deficiente), 105 (adecuado) y 145 (adecuado) μg/dL Zn, respectivamente.

5.3.2 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides y en la motilidad espermática

La suplementación con Zn no modificó la viabilidad de los espermatozoides al inicio (0 h) o luego de 3 h de cultivo ($P > 0,05$). Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides vivos después de 6 h de incubación fue significativamente mayor en los

medios de FIV suplementados con 80 y 120 µg/dL de Zn (P = 0,02). La viabilidad obtenida con la adición de 0 y 40 µg/dL de Zn luego de 6 h fue similar (P = 0,17; Tabla 5.1).

El porcentaje de espermatozoides positivos a HOST luego de 3 h fue más alto con el agregado de 80 µg/dL de Zn (P = 0,03). Sin embargo, no existió diferencias entre los tratamientos a las 0 o 6 h (P > 0,05; Tabla 5.1).

Los espermatozoides incubados con el agregado de 80 y 120 µg/dL de Zn mostraron un incremento en la MP a las 3 h (P = 0,03), mientras que a las 6 h la MP fue mayor con el agregado de 80 µg/dL de Zn (P = 0,03), sin existir diferencias entre 0, 40 y 120 µg/dL de Zn (P = 0,99; Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Efecto de diferentes concentraciones de zinc adicionadas al medio de FIV sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos y la motilidad espermática.

Suplementación con Zn	Viabilidad (%)			HOST positivo (%)			Motilidad progresiva (%)		
	0 h	3 h	6 h	0h	3h	6h	0h	3h	6h
0 µg/dL	80.7	74.5	64.2^{a}	39.0	18.2^{a}	17.5	75.0	37.5^{a}	0.0^{a}
40 µg/dL	82.2	74.9	67.1^{ab}	36.7	19.5^{a}	18.7	77.5	45.0^{a}	2.5^{a}
80 µg/dL	82.6	77.5	69.0^{bc}	38.0	24.7^{b}	23.2	72.5	57.5^{b}	10.0^{b}
120 µg/dL	81.5	77.1	71.0^{c}	40.7	18.7^{a}	19.7	72.5	55.0^{b}	2.5^{a}

Viabilidad (integridad estructural de la membrana del espermatozoide), HOST (prueba de hinchazón hipoosmótica; integridad funcional de la membrana del espermatozoide) y Motilidad Progresiva se expresan en porcentajes (tres réplicas en diferentes días). Las variables mencionadas se evaluaron en espermatozoides cultivados en medio de FIV suplementado con 0, 40, 80 y 120 µg/dL de Zn a las 0, 3 y 6 h de incubación. Letras diferentes en la misma columna (a, b, c) indican diferencias significativas (P ≤ 0,05).

5.3.3 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre el EA

Los espermatozoides suplementados con Zn mostraron un mayor porcentaje de acrosomas intactos a las 3 h de incubación ($P < 0,01$). En ese punto del tiempo, los espermatozoides suplementados con 80 µg/dL de Zn obtuvieron el porcentaje más alto de acrosomas intactos ($P = 0,04$). Después de 6 h de incubación no hubo diferencias entre los grupos ($P = 0,94$; Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Efecto de diferentes concentraciones de zinc en el medio de FIV sobre el estatus acrosomal.

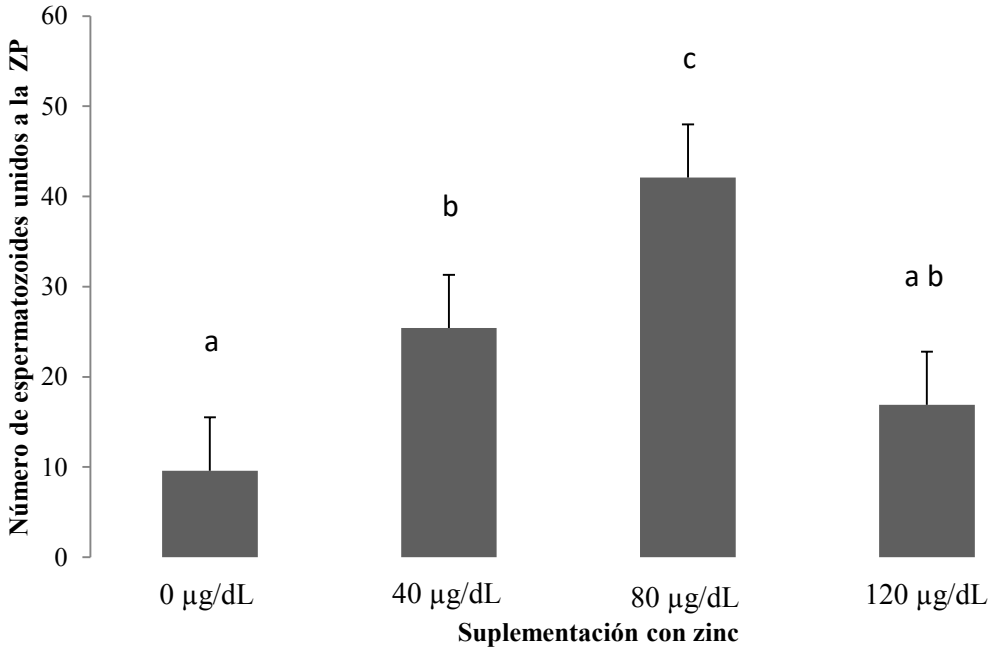
Suplementación con Zn	Espermatozoides con el acrosoma intacto (%)		
	0 h	3 h	6 h
0 µg/dL	75.5	44.8[a]	43.0
40 µg/dL	76.0	52.5[b]	44.0
80 µg/dL	75.0	64.0[c]	45.5
120 µg/dL	78.0	49.5[b]	44.0

Porcentaje de espermatozoides bovinos con el acrosoma intacto cultivados en medio FIV suplementados con 0, 40, 80 y 120 µg/dL de Zn. La evaluación se realizó a las 0, 3 y 6 h de incubación. [a, b, c] Valores con diferentes letras en la misma columna difieren entre sí ($P \leq 0,05$).

5.3.4 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre la unión de espermatozoides a la ZP

La suplementación al medio de FIV con 40 y 80 µg/dL de Zn incrementó el número de espermatozoides unidos a la ZP respecto al medio no suplementado ($P < 0,01$). Sin embargo, no existió diferencias entre 0 y 120 µg/dL de Zn ($P = 0,35$; Figura 5.1).

Figura 5.1. Efecto de diferentes concentraciones de zinc en el medio de FIV sobre la unión de espermatozoides en la zona pelúcida (ZP).



[a,b,c] Columnas con diferentes letras difieren estadísticamente (P < 0,05). Los datos se expresan como medios de mínimos cuadrados ± error estándar de la media (n=73 ovocitos desnudos en tres réplicas). Ovocitos y espermatozoides fueron incubados por 2 h y luego teñidos con Hoechst 33342. El número de espermatozoides unidos a la ZP se determinó por observación bajo un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 200x.

5.3.5 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre la formación de pronúcleos

La presencia de dos pronúcleos (fecundación normal), polispermia (más de dos pronúcleos) y el porcentaje de ovocitos maduros penetrados no fue diferente entre los tratamientos (P > 0,71; Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Estado de fecundación de los presuntos zigotos producidos con distintas concentraciones de zinc en el medio de FIV.

Suplementación con Zn	N° de ovocitos evaluados	Ovocitos n (**%**)				
		ONF	1PN	2PN	>2PN	Penetrados
0 µg/dL	120	9 (7,5)	10 (8,3)	93 (77,5)	8 (6,7)	111 (92,5)
40 µg/dL	131	10 (7,6)	7 (5,3)	106 (80,9)	8 (6,1)	121 (92,3)
80 µg/dL	132	11 (8,3)	7 (5,3)	107 (81,1)	7 (5,3)	121 (91,6)
120 µg/dL	131	13 (9,9)	11 (8,4)	100 (76,3)	7 (5,3)	118 (90)

PN= Pronúcleos. **ONF**= Ovocitos no fecundados. La tasa de pronúcleos se determinó a las 18 h posteriores a la inseminación (n=514 COC madurados y fecundados en 6 réplicas). Los presuntos zigotos fueron incubados en Hoechst 33342 y luego examinados bajo microscopio de fluorescencia con un aumento de 200x y 400x. No hubo diferencias entre tratamientos (P > 0,05).

5.3.6 Efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre el desarrollo embrionario posterior

El agregado de Zn al medio de FIV no modificó la tasa de clivaje, de blastocistos o de eclosión (P > 0,05; Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Efecto de diferentes concentraciones de zinc en el medio de FIV sobre el desarrollo embrionario posterior.

Suplementación con Zn	N° de ovocitos	Clivaje (%)	Blastocistos/ovocitos (%)	Eclosión (%)
0 µg/dL	197	81,0	30,4	33,9
40 µg/dL	206	80,5	31,1	41,0
80 µg/dL	199	74,5	27,1	43,7
120 µg/dL	204	74,3	31,8	33,3
Valor de P		0,31	0,39	0,62

El medio de FIV fue suplementado con 0, 40, 80 y 120 µg/dL de Zn. El porcentaje de clivaje se registró a las 48 h posteriores a la inseminación. Se consideraron blastocistos a aquellos embriones que alcanzaron el estado de blastocisto expandido o eclosionado al día 8 de cultivo. La tasa de eclosión se registró al día 10. Todos los valores de clivaje,

desarrollo y eclosión son expresados en porcentaje (n=806 COC en seis réplicas). No hubo diferencias entre tratamientos (P > 0,05).

5.4 DISCUSIÓN

El oviducto no solo sirve como un corredor que transporta gametas y al embrión, sino que también, provee de factores nutricionales necesarios para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Li y Winuthayanon, 2017). En particular, la composición iónica del líquido oviductal es importante para la maduración final de los espermatozoides y la fecundación (Hugentobler y col., 2007). La suplementación con 80 y 120 µg/dL de Zn incrementó la viabilidad de los espermatozoides bovinos luego de 6 h de incubación (ver Tabla 5.1). Estos resultados están en concordancia con los observados por Dorostkar y col. (2014), quienes encontraron que el agregado de sulfato de Zn al diluyente de semen de búfalo mejora su viabilidad. Una posible explicación es que el Zn favorece la estabilización de lisosomas, ribosomas, ADN y ARN, lo que resulta en una mayor supervivencia y normal funcionamiento de los espermatozoides (Bettger y O'Dell, 1981, Blazak y Overstreet, 1982; Sorensen y col., 1999; Omu y col., 2008; Dorostkar y col., 2014). Por otro lado, las metaloenzimas dependientes de Zn cumplen un rol fundamental en la viabilidad y función espermática, como es el caso de la Cu/Zn-SOD, la cual protege al espermatozoide frente al daño oxidativo (Álvarez y col., 1987; Zini y col., 2002; Kawakami y col., 2007; Wu y col., 2015). La actividad Cu/Zn-SOD, en el espermatozoide, es varias veces superior respecto a la observada en diferentes tipos de células somáticas (Kerns y col., 2018a). El mismo autor, menciona que es esencial un balance entre la generación del radical superóxido y su dismutación para una apropiada función espermática. Se ha demostrado previamente que la suplementación con Zn en el medio de MIV incrementa la actividad de la Cu/Zn-SOD en los COC bovinos (Anchordoquy y col., 2014). Otra posible explicación del aumento en la viabilidad es, que la actividad de la enzima Cu/Zn-SOD se encuentre incrementada en los espermatozoides. Sin embargo, es una especulación ya que su medición no fue incluida en este trabajo. Más

estudios son necesarios para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Zn en el medio de FIV sobre la actividad de la enzima Cu/Zn-SOD en los espermatozoides bovinos.

La suplementación con 80 µg/dL de Zn incrementó la proporción de espermatozoides positivos a HOST, demostrando que la suplementación no solo mejora la integridad, sino también, la funcionalidad de la membrana de los espermatozoides. La suplementación con 0, 40, 80 y 120 µg/dL de Zn a un medio diferente de FIV cuya composición no incluye penicilamina, produjo valores de viabilidad y HOST muy similares a los reportados en este capítulo, demostrando lo uniforme que puede resultar la respuesta al Zn incluso al utilizar medios de cultivo diferentes (Galarza y col., 2020; enviado para su publicación). Este efecto benéfico del Zn podría estar relacionado a su capacidad de estabilizar las membranas celulares (Eggert Kruss y col., 2002). La suplementación con el mineral también mejoró la motilidad progresiva de las células espermáticas. El Zn participa en el control de la utilización de la energía a través del sistema de ATP y de la regulación de las reservas de energía de los fosfolípidos, además, mejora la captación de oxígeno por parte de los espermatozoides (Kumar y col., 2006). El Zn forma parte de las metaloenzimas sorbitol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa las cuales cumplen roles significativos en la motilidad espermática (Kumar y col., 2006). Por otro lado, la suplementación con 82 µg/dL de Zn posee un efecto protector sobre la viabilidad y la motilidad espermática contra las especies reactivas del oxígeno inducidas *in vitro* (Wu y col., 2015).

Solo los espermatozoides mótiles con el acrosoma intacto son capaces de unirse a la ZP (Hoodbhoy y Dean, 2004). En este trabajo, la suplementación con Zn provocó un patrón de respuesta similar tanto en el número de espermatozoides unidos a la ZP (2 h de cultivo) como en el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto (3 h de cultivo, Figura 5.1 y Tabla 5.2). La suplementación con 80 µg/dL de Zn mejora la integridad de los acrosomas, lo cual podría ser la causa del incremento en el número de

espermatozoides unidos a la ZP. La mejoría registrada en los acrosomas podría deberse a la capacidad del Zn para estabilizar las membranas celulares e inhibir la peroxidación lipídica (Eggert Kruss y col., 2002). Además, el Zn estabiliza enzimas acrosomales como la acrosina, la fosfolipasa y la fosfatasa ácida (Kumar y col., 2006). Los hallazgos en este trabajo están en concordancia con estudios realizados en búfalo y en humanos donde se observó que la presencia de Zn en el medio de cultivo incrementa la integridad del acrosoma (Riffo y col., 1992; Bilaspuri y Babbar, 2007).

La unión de los espermatozoides a la ZP es un evento clave en el proceso de fecundación (Coutinho da Silva y col., 2012). De hecho, la prueba de union a la ZP es muy utilizada para estimar la capacidad de fecundación espermática en varias especies, incluso en el bovino (Ivanova y Mollova, 1993; Fazeli y col., 1995; Zhang y col., 1999; Coutinho da Silva y col., 2012). Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren de aquellos observados por Liu y col. (2009), donde la suplementación con Zn al medio de cultivo no modificó la unión espermatozoide-ZP. Sin embargo, la concentración utilizada en el presente trabajo de tesis fue 40 veces menor que la utilizada por Liu y col, (2009) lo cual podría explicar las diferencias encontradas.

En general, los datos muestran que la adición de 80 µg/dL de Zn al medio de FIV obtuvo los mejores resultados en los diferentes parámetros espermáticos evaluados. Es interesante destacar que la concentración final de Zn en el medio de FIV alcanzada luego de dicha suplementación es considerada adecuada para el estatus de Zn en bovinos (>90 µg/dL). Sin embargo, la suplementación con 120 µg/dL de Zn, también considerada adecuada, disminuyó el número de espermatozoides unidos a la ZP y los porcentajes de espermatozoides positivos a HOST y con el acrosoma intacto a las 3h respecto a 80 µg Zn/dL. Estos resultados indican que la suplementación con 120 µg/dL de Zn podría ser demasiado alta en condiciones *in vitro* dado que más del 95% del Zn en el individuo (*in vivo*) se encuentra unido a proteínas como la albúmina y α2-macroglobulina (Kambe y

col., 2015), mientras que la suplementación *in vitro* se realizó utilizando sulfato de Zn, adicionando mineral al medio de FIV pero en su forma libre. Se ha demostrado que altas concentraciones de Zn inhiben la motilidad espermática y la RA *in vitro* (Kerns y col., 2018a). Además, la presencia de altos niveles de Zn en el semen inhibe la función de los receptores de manosa ubicados en la cabeza del espermatozoide, responsables del reconocimiento de la ZP (Benoff, 1993; Mankad y col., 2006). De acuerdo con Kerns y col. (2018b), el Zn puede unirse a oligosacáridos de la ZP, alterando su polaridad y reduciendo la unión espermatozoide-ZP. El Zn sobre la superficie del espermatozoide tendría un efecto similar y probablemente producido por un cambio conformacional de la membrana (Kerns y col., 2018b).

En el presente trabajo, a pesar de que la suplementación con Zn incrementó la calidad espermática, no modificó la fecundación (tasa de clivaje) ni el desarrollo embrionario temprano (tasa de blastocisto). Estos resultados concuerdan con los informados por Stephenson y Brackett (1999) a pesar de haber utilizado un medio de FIV (medio Brackett y Oliphant) y una fuente de Zn ($ZnCl_2$) diferente. Es de destacar, que el microambiente generado por la suplementación con Zn durante la FIV no solo afecta al espermatozoide sino también al ovocito y al embrión. En este sentido, se ha demostrado que si bien la suplementación del medio de FIV con 1000 µg/dL de Zn disminuye la motilidad espermática durante su capacitación, también incrementa la tasa de clivaje luego de la FIV (Stephenson and Brackett, 1999). Estos resultados, en conjunto con los aquí presentados, sugieren que los espermatozoides, los ovocitos y los embriones tienen diferentes requerimientos *in vitro* de Zn.

5.5 CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la suplementación con Zn (principalmente 80 µg/dL) al medio de cultivo mejora la calidad espermática. Sin

embargo, cuando es adicionado durante la FIV, éste no modifica el desarrollo embrionario temprano en el bovino.

CAPÍTULO 6

EVALUACIÓN DE LA ZINCEMIA EN TERNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA*

6.1 INTRODUCCIÓN

El Zn es un mineral esencial en el crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos, donde cumple un rol catalítico, estructural y regulatorio en la actividad celular de los mamíferos (Rosa y col., 2008). Como se mencionó anteriormente, el Zn forma parte de más de 300 metaloenzimas y 900 factores de activación de la transcripción del genoma, lo que da idea de la importancia de este mineral en la homeostasis animal (Tapiero y Tew, 2003). Por esta razón, la carencia de Zn en bovinos genera consecuencias variadas e inespecíficas, entre las que se mencionan disminución en la ganancia diaria de peso (Rosa y col., 2008), caída del consumo y de la eficiencia de conversión alimenticia (Underwood y Suttle, 1999), fallas inmunológicas (Kincaid y col., 1997) y disminución en la eficiencia reproductiva (Sekler y col., 2007; Picco y col., 2010).

La homeostasis del Zn es compleja y sólo parcialmente conocida. A diferencia de lo que ocurre con otros minerales traza, el Zn no posee un órgano de almacenamiento que le permita mantener niveles adecuados ante una eventual disminución en su consumo (Mattioli, 2019a). Sin embargo, el Zn presente en el plasma, dentro de organelas celulares (aparato de Golgi y retículo endoplásmico, principalmente) y el unido a la metalotioneína constituye una pequeña reserva capaz de amortiguar las necesidades celulares de todo el organismo (King, 2011).

Cuando el consumo de Zn por parte del animal es menor al requerido, se limitan las pérdidas endógenas y aumenta la eficiencia de absorción (King y col., 2001). Estos mecanismos están muy bien regulados por dos familias de transportadores de Zn. Una de ellas corresponde a los *Zinc Transporter* (ZnT), que disminuyen la concentración

citoplasmática de Zn al mediar el flujo de salida del mineral hacia el líquido extracelular, o al introducir el Zn en distintas organelas celulares. El segundo grupo corresponde a la familia ZIP, que aumentan la concentración citoplasmática de Zn realizando la función opuesta (Cousins y col., 2006).

Si bien no existen indicadores confiables del estatus de Zn, el más utilizado es la concentración de Zn en suero o plasma (Underwood y Suttle, 1999). Sin embargo, la zincemia suele ser un marcador inestable y puede variar sin tener consecuencias para el animal (Rosa y col., 2008). En roedores, la zincemia desciende ante la respuesta de fase aguda, como lo es la inflamación, trauma, infección o estrés (Lichten y Cousins, 2009; Aydemir y col., 2012; Aburto-Luna y col., 2017). Sin embargo, la información sobre las variaciones de zincemia ante situaciones estresantes y/o de enfermedad en el bovino resulta escasa.

La enfermedad respiratoria bovina (ERB) es la principal causa de enfermedad y muerte en explotaciones de engorde a corral (Galvan y col., 2014), y la segunda en importancia en terneros en explotaciones extensivas de cría en Argentina (Costa y col., 2004). Si bien la ERB es producto de una compleja interacción entre estrés, virus y bacterias (Fazzio y Landoni., 2010) es ampliamente aceptado que *Mannheimia haemolytica* cumple un rol determinante en la fisiopatogenia de la enfermedad (Rice y col., 2007). En estudios previos, se observaron variaciones de la zincemia en terneros desafiados experimentalmente con el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y en animales que padecían ERB crónica (Orr y col., 1990; Chirase y col., 1991; Soltesova y col., 2015). No obstante, no hay estudios realizados en terneros, con infecciones respiratorias agudas de origen bacteriano, donde se evalúen las variaciones en las zincemias.

La hipótesis del presente capítulo consiste en que la infección con *M. haemolytica* disminuye la zincemia. Para corroborar dicha hipótesis, se realizó un ensayo donde se

evaluó el efecto de la infección experimental por *M. haemolytica* sobre la variación de la zincemia en terneros.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos realizados en el presente ensayo fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata. Registrado en el Protocolo para el Uso de Animales de Investigación Científica (Identificación interna Nº 55-2-18P).

El presente ensayo incluyó 14 terneros machos de raza Holando argentino que provinieron de un establecimiento de producción láctea de Chascomús, Bs. As., con un peso vivo de 67,7 ± 7,7 kg. Al momento del arribo, los terneros se alojaron en las instalaciones del Hospital Escuela de Grandes Animales de la FCV-UNLP en un potrero especialmente preparado para el presente ensayo. El sistema de crianza fue individual en estaca. La dieta consistió de alimento balanceado comercial especialmente formulado para la edad y peso de los animales (1,8 kg/día) y fardo de alfalfa *ad libitum*.

6.2.1 Criterio de inclusión

Todos los animales, luego de un período de adaptación a las instalaciones y alimento (siete días), se encontraban en buen estado de salud, con los parámetros clínicos y hematológicos dentro del rango considerado normal (resultados no mostrados).

6.2.2 Formación de grupos y desafío experimental

Los terneros fueron asignados al azar a uno de los siguientes grupos. Grupo infectado (GI, n=8) los cuales fueron desafiados experimentalmente con una cepa de *M. haemolytica* y grupo control (GC, n=6) quienes recibieron un placebo. El inóculo bacteriano se realizó a partir de una cepa de campo de *M. haemolytica* (provista por el Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico, FCV- UNLP), la cual al momento de la inoculación experimental se encontraba en la fase logarítmica del crecimiento. La

concentración del inóculo fue ajustado a la escala 0,5 del método nefelométrico de Mac Farland, con un conteo viable final de 6,5 x 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/ mililitro de inóculo bacteriano). La inoculación se realizó a las 8:00 a.m. mediante endoscopía buco-traqueal, con 8 mL de inóculo bacteriano y 8 mL de solución fisiológica estéril (solución de lavado), distribuidos equitativamente entre el bronquio derecho y el bronquio izquierdo. El GC recibió solución fisiológica con idéntico procedimiento, vía de administración y volumen total. El momento de la inoculación fue considerado como día 0 del ensayo.

6.2.3 Muestras de sangre

Se extrajeron muestras de sangre entera, por punción yugular, para determinación de Zn en plasma y recuento de leucocitos totales, previo a la infección experimental (día 0), y diariamente hasta la finalización del ensayo (día 1, 2, 3, 4 y 5). Para la determinación de la zincemia, las muestras de sangre se recolectaron en tubos plásticos de 10 mL previamente lavados con detergente no-iónico y ácido nítrico, con heparina sódica como anticoagulante; para el recuento de leucocitos se utilizaron tubos plásticos, especialmente preparados, los cuales contenían EDTA como anticoagulante. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

6.2.4 Procesamiento de las muestras

Para la determinación de la zincemia, las muestras fueron centrifugadas, dentro de los 60 minutos posteriores a la extracción, a 3000 rpm durante 5 minutos. El plasma obtenido fue desproteinizado con ácido tricloracético al 10% (p/v), centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos y en el sobrenadante se determinó la concentración de Zn por espectrofotometría de absorción atómica de llama (A. Analyst 200 – Perkin Elmer), utilizando estándares de 0, 50, 100 y 200 µg/dL para generar la curva de calibración del equipo.

El recuento de leucocitos se realizó dentro de las 6 horas posteriores a la extracción por el método manual, a través de la cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Ióvine y Selva, 1985).

6.2.5 Evaluación clínica

La evaluación clínica se realizó siguiendo los criterios propuestos por el "Método Wisconsin para diagnóstico de Enfermedad Respiratoria en bovinos de leche" disponible en:

https://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/8calf/calf_health_scoring_chart.pdf

(ver Anexo 6.1). Los animales con puntuación 5 o superior fueron considerados clínicamente enfermos.

En aquellos animales que durante el ensayo presentaron depresión marcada, indiferencia al estímulo e incapacidad de levantarse por sus propios medios se aplicó el criterio de punto final y sacrificio humanitario estipulado en el protocolo de CICUAL.

6.2.6 Eutanasia y evaluación de lesión pulmonar

Las eutanasias realizadas por razones humanitarias, se llevaron a cabo con previa sedación y anestesia profunda, mediante una combinación de Xilacina 10 % y Ketamina 5 % (1 mL y 4 mL respectivamente). Luego se realizó el sacrificio propiamente dicho, mediante electrocución. Una vez confirmada la muerte, mediante reflejo corneal, se incidieron ambas yugulares para producir el desangrado. Se realizó la necropsia completa, los pulmones fueron removidos del cadáver y se realizó la estimación de consolidación (por palpación directa) de cada uno de los lóbulos. El porcentaje final de lesión pulmonar fue determinado mediante la siguiente fórmula: (0,053 x porcentaje afectado del segmento craneal del lóbulo izquierdo) + (0,049 x porcentaje afectado del segmento caudal del lóbulo izquierdo) + (0,319 x porcentaje afectado del lóbulo caudal izquierdo) + (0,043 x porcentaje afectado del lóbulo accesorio) + (0,352 x porcentaje afectado del lóbulo caudal derecho) + (0,061 x porcentaje afectado del lóbulo medio derecho) + (0,060 x porcentaje afectado del segmento caudal del lóbulo craneal derecho) + (0,063 x

porcentaje afectado del segmento craneal del lóbulo craneal derecho) según lo propuesto por Fajt y col. 2003.

6.2.7 Cultivo bacteriológico

De los animales que debieron ser sacrificados, se tomaron muestras de pulmón (específicamente de las zonas consolidadas) las cuales fueron acondicionadas y derivadas para marcha bacteriológica de rutina al Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico (LADIB- Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP).

6.2.8 Análisis estadístico

Para explicar la variabilidad en la zincemia, el recuento leucocitario y el *score* de enfermedad respiratoria se ajustó un modelo mixto de regresión lineal con medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED de SAS (9.4). Las variables fijas fueron tratamiento (grupo), tiempo (día) y la interacción entre ambos. La variable aleatoria fue el animal. La separación de medias se realizó mediante el procedimiento SLICE dentro del mismo programa estadístico cuando las diferencias fueron significativas en la interacción. Los valores de probabilidad que se consideraron significativos fueron de $P \leq 0,05$. Se consideró una tendencia el valor de $P \leq 0,1$. Los valores de zincemia, recuento leucocitario y *score* de enfermedad respiratoria para los diferentes niveles de la variable tiempo (día) se expresan como medias de los mínimos cuadrados (MMC).

6.3 RESULTADOS

Las tres variables explicativas; tiempo, tratamiento y la interacción (tiempo * tratamiento) tuvieron un efecto significativo sobre la zincemia ($P < 0,01$; $P = 0,04$; $P < 0,01$; respectivamente). Los valores de zincemia en los días 1, 2 y 3 fueron menores en el GI respecto al GC (46 vs 108 µg/dL, $P < 0,01$; 71 vs 109 µg/dL, $P = 0,03$ y 69 vs 107 µg/dL, $P = 0,03$; respectivamente; Figura 6.1).

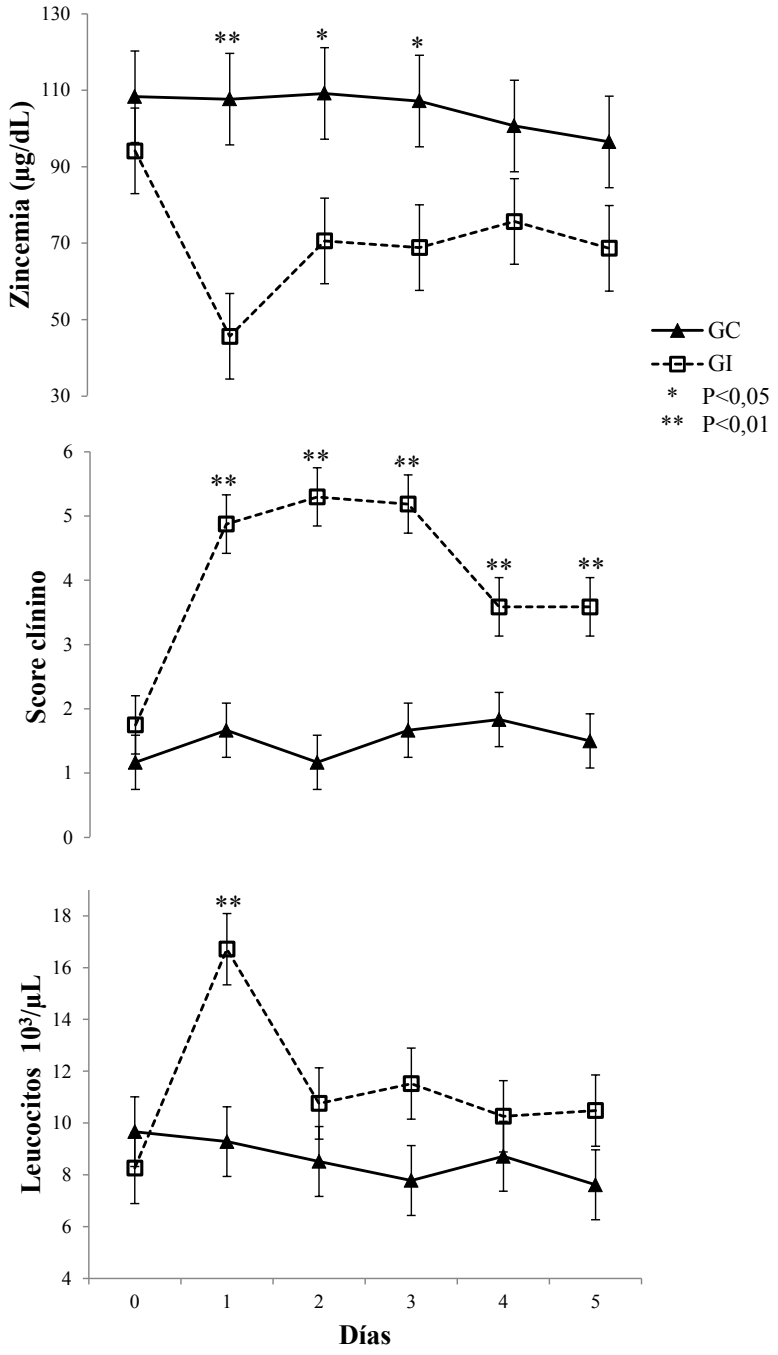
El *score* clínico también fue estadísticamente diferente para la variable tiempo, tratamiento y la interacción tiempo * tratamiento ($P < 0,01$ para las tres variables), las cuales se mantuvieron a lo largo de todo el ensayo (Figura 6.1).

El recuento leucocitario también evidenció diferencias estadísticas en la variable tiempo y en la interacción tiempo * tratamiento ($P < 0,01$), y una tendencia en la variable tratamiento ($P = 0,07$). Los grupos solo se diferenciaron en el día 1, la MMC fue de 16,7 leucocitos x 10^3/µL en el GI y de 9,8 leucocitos x 10^3/µL para el GC ($P < 0,01$). En el día 3 tendieron a diferenciarse, con valores de recuento de 11,5 leucocitos x 10^3/µL para el GI y 7,8 leucocitos x 10^3/µL para el GC ($P = 0,06$; Figura 6.1).

Durante el transcurso del ensayo, tres animales pertenecientes al GI debieron ser sacrificados por razones humanitarias. Los mismos presentaban depresión marcada e indiferencia al estímulo, al alimento y al agua de bebida. El diagnóstico anatomopatológico en los tres animales fue de bronconeumonía fibrinosa severa aguda y no se encontraron lesiones de carácter diagnóstico en otros aparatos y sistemas. El primero de ellos fue sacrificado el día 2 y en la necropsia se determinó una consolidación pulmonar de 35,46%. Los dos restantes fueron sacrificados el día 3, con el 42,61% y el 40,50% de consolidación pulmonar respectivamente.

El cultivo bacteriológico realizado a partir de las muestras de necropsia evidenció desarrollo de *M. haemolytica* en los tres animales analizados.

Figura 6.1. Medias de los mínimos cuadrados y error estándar de la media de las zincemias, *score* clínico y recuento de leucocitos totales en los grupos durante el ensayo.



Día 0: valores registrados previo a la inoculación experimental.
GC: grupo control (n=6)
GI: grupo infectado (n=8) experimentalmente con *M haemolytica* (6,5 x 10^6 UFC/ml.)
En el GI, un animal el día 2 y dos animales el día 3 debieron ser sacrificados por razones humanitarias.

6.4 DISCUSIÓN

De acuerdo con la hipótesis planteada, la infección experimental con *M. haemolytica* disminuye la zincemia en terneros. Como se mencionó anteriormente la misma puede sufrir variaciones de acuerdo al estado de salud del animal (Soltesova y col., 2015; Middleton y col., 2004; Lohuis y col., 1988). En el presente ensayo se observó una disminución significativa en los valores de zincemia del GI con respecto al GC, los tres días posteriores a la inoculación. En el día 1, se registró el menor valor de zincemia, coincidiendo con el momento en el que se observó un marcado aumento en el recuento leucocitario y en el *score* clínico. Un comportamiento similar de la zincemia se observó en varios estudios realizados en bovinos donde se evaluaron otros parámetros de respuesta del organismo ante infecciones bacterianas o virales. Erskine y Bartlett (1993) describieron una caída de la zincemia 4 h después del pico de temperatura rectal, causado por una infección experimental intramamaria con *Escherichia coli.* Middleton y col. (2004) describen una caída en la zincemia 24 h posteriores a la inoculación intramamaria con *Staphylococcus aureus*, en coincidencia con el pico de presencia de células somáticas en leche. Por otro lado, en un ensayo realizado por Orr y col. (1990) también se observó una disminución de la zincemia 4 días después de la inoculación intranasal con el virus de IBR, momento en el cual se produjo el pico de morbilidad, determinada por el aumento de la temperatura rectal, descarga ocular, descarga nasal, anorexia y depresión.

Los valores medios de zincemias del GI, desde el día 1 hasta el final del ensayo, se encontraron por debajo del valor de estatus normal de Zn (90 µg/dL) (Enjalbert y col., 2006). Esta disminución podría deberse a una redistribución corporal del Zn con el fin de privar a los microorganismos de nutrientes esenciales para su supervivencia, fenómeno conocido como inmunidad nutricional (Corbin y col., 2008; Gammoh y Rink 2017). La reducción de la zincemia ante una infección está relacionada, al menos en parte, a la liberación de citoquinas, como la Interleuquina 1β (IL-1β) y la Interleuquina 6 (IL-6). Estas, incrementan la transcripción génica del transportador ZIP14 principalmente en el

hígado, lo que favorece el ingreso de Zn a los hepatocitos desde la sangre con la consecuente disminución de la zincemia (Liuzzi y col., 2005). Además, se ha descripto un aumento en la transcripción de ARNm del transportador de membrana ZIP8 en monocitos sanguíneos, que produce una mayor captación de Zn desde la sangre por dichas células (Besecker y col., 2011).

Producto de la redistribución corporal de Zn, los niveles del metal en hígado aumentan; este micronutriente participa en el sistema de defensa antioxidante de dicho órgano, lo que reduciría el daño a causa del estrés oxidativo durante la infección (Sakaguchi y col., 2002). Por otro lado, los niveles elevados de Zn en hígado garantiza la disponibilidad del mineral en un momento de alto consumo debido al incremento en la síntesis de proteínas de fase aguda y de citoquinas (Alker y Haase, 2018).

La *M. haemolytica* es el principal agente infeccioso detectado en casos de ERB en engorde a corral (Galván y col., 2014) y rodeos de cría en Argentina (Costa y col., 2004). La misma, ha sido identificada mediante aislamientos y/o detección por técnicas moleculares de casos clínicos de ERB (Streitenberger y col., 2016; Fazzio y Landoni 2010; Fazzio y col., 2010). A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos afirmar que la infección con *M. haemolytica* disminuye los valores de zincemia en terneros.

La zincemia es la herramienta diagnóstica más utilizada para evaluar el estatus de Zn en el bovino (Underwood y Suttle, 1999). Sin embargo, como muestra el presente trabajo, el estado clínico (sano/enfermo) de los animales debe ser tenido en cuenta al momento de la interpretación de su valor. De esta manera se podrán evitar errores en el diagnóstico de estatus de zinc en rodeos bovinos.

6.5 CONCLUSIÓN

La infección experimental con *M. haemolytica* en terneros modificó el *score* clínico, recuento de leucocitos y disminuyo la concentración de Zn en plasma. Los valores de zincemia en bovinos deben ser interpretados teniendo en cuenta la presencia de afecciones (enfermedades) intercurrentes.

CONCLUSIONES FINALES

- Las zincemias de vacas en rodeos de cría de la CDRS mostraron una distribución homogénea en la región. El 31,4% de las vacas de cada rodeo presentaron valores de deficiencia.
- No se encontró asociación entre la zincemia de vacas y terneros y las concentraciones de Zn en el forraje y el suelo.
- Existen variaciones de la concentración de Zn en el forraje en función de la estación climática y la topografía del terreno, observándose los valores más altos en el terreno bajo durante el otoño y los valores más bajos en la media loma durante el verano.
- La suplementación parenteral con Zn no incrementa la GDP en terneros durante el período de cría o al inicio del sistema de engorde a corral cuando presentan zincemias normales.
- La suplementación parenteral con Zn, al inicio de un protocolo de IATF, incrementa el tamaño del folículo preovulatorio, la concentración plasmática de P4 y el porcentaje de preñez en vacas de cría sin modificar la zincemia.
- La suplementación con Zn (80 µg/dL) al medio de FIV mejora la calidad espermática. Sin embargo, no modifica el desarrollo embrionario temprano en el bovino.
- La infección experimental con *M. haemolytica* disminuye la zincemia en terneros.

ANEXOS

6.1 Método Wisconsin para el diagnóstico de Enfermedad Respiratoria en bovinos de leche

CRITERIO DE PUNTUACIÓN DE SALUD DE LOS TERNEROS			
0	**1**	**2**	**3**
Temperatura rectal (°C)			
37,8 - 38,3	**38,4 – 38,8**	**38,9 – 39,4**	**≥39,5**
Tos			
Ausencia	**Tos inducida y sin repetición**	**Tos inducida repetida o tos espontánea ocasional**	**Tos espontánea repetida**
Descarga nasal			
Escasa cantidad de descarga serosa (normal)	**Escasa cantidad de descarga turbia unilateral**	**Abundante cantidad de descarga turbia o mucosa bilateral**	**Abundante cantidad de descarga mucopurulenta bilateral**
Puntuación ocular			
Normal	**Escasa cantidad de exudado**	**Moderada cantidad de exudado bilateral**	**Gran cantidad de exudado**
Puntuación auricular			
Normal	**Movimiento de orejas o sacudimiento de cabeza**	**Ligero descenso unilateral de las orejas**	**Inclinación de la cabeza o descenso bilateral de las orejas**

BIBLIOGRAFÍA

1. Aburto-Luna V, Treviño S, Santos-López G, Moroni-González D, Calva-Cruz O, Aguilar-Alonso P y col. Hepatic mobilization of zinc after an experimental surgery, and its relationship with inflammatory cytokines release, and expression of metallothionein and Zip14 transporter. Inflamm Res. 2017; 66(2): 167-175.
2. Ahola JK, Baker DS, Burns PD, Mortimer RG, Enns RM, Whittier JC, Geary TW, Engle TE. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. J Anim Sci. 2004; 82(8): 2375-2383.
3. Al-Gubory KH, Garrel C, Faure P, Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. Reprod Biomed. 2012; 6: 551-560. [Online].
4. Alimohamady R, Aliarabi H, Bruckmaier RM, Christensen RG. Effect of Different Sources of Supplemental Zinc on Performance, Nutrient Digestibility, and Antioxidant Enzyme Activities in Lambs. Biol Trace Elem Res. 2019; 189(1): 75-84.
5. Alker W, Haase H. Zinc and Sepsis. Nutrients. 2018; 10(8). pii: E976.
6. Aller JF, Callejas SS, Alberio RH. Biochemical and steroid concentrations in follicular fluid and blood plasma in different follicular waves of the estrous cycle from normal and superovulated beef cows. Anim Reprod Sci. 2013; 142(3-4): 113-20.
7. Alley MM, Martens DC, Schnappinger MG, Hawkins GW. Field Calibration of Soil Tests for Available Zinc. Soil Sci Soc Am J. 1972; 36: 621-624.
8. Alsaad KM, Al-Sadi HI, Abdul-Majeed MO. Clinical And Pathological Studies On Naturally Occurring Zinc Deficiency (Hypozincemia) In Buffalo Calves.

Proceedings of the 4th Scientific Conference. College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Iraq. 2006; 1: 97-107.

9. Álvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J Androl. 1987; 8: 338-348.
10. Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Sirini MA, Picco SJ, Peral-García P, Furnus CC. The importance of having zinc during in vitro maturation of cattle cumulus-oocyte complex: role of cumulus cells. Reprod Domest Anim. 2014; 49 (5): 865-874.
11. Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Pascua AM, Nikoloff N, Peral-García P, Furnus CC. The copper transporter (SLC31A1/CTR1) is expressed in bovine spermatozoa and oocytes: Copper in IVF medium improves sperm quality. Theriogenology. 2017; 97: 124-133.
12. Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Galarza EM, Farnetano NA, Giuliodori MJ, Nikoloff N, Fazzio LE, Furnus CC. Parenteral Zinc Supplementation Increases Pregnancy Rates in Beef Cows. Biol Trace Elem Res. 2019; 192(2): 175-182.
13. Andreani C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. J Proteome Res. 2006; 5(1): 196-201.
14. Andreini C, Bertini I. A Bioinformatics View of Zinc Enzymes. J Inorg Biochem. 2012; 111: 150-156.
15. Anton A, Solcan, G, Solcan, C. The impact of copper and zinc deficiency on milk production performances of intensively grazed dairy cows on the North-East of Romania. World Acad Sci Eng Technol. 2013; 75: 1319-1331.
16. Apgar J. Zinc and reproduction. Ann Rev Nutr. 1985; 5: 43-68.
17. Apgar J. Zinc and reproduction: An update. J Nutr Biochem. 1992; 3: 266-278.

18. Aydemir TB, Chang SM, Guthrie GJ, Maki AB, Ryu MS, Karabiyik A, Cousins RJ. Zinc Transporter ZIP14 Functions in Hepatic Zinc, Iron and Glucose Homeostasis during the Innate Immune Response (Endotoxemia). PLoS One 2012; 7(10): e48679.

19. Balbuena O, McDowell LR, Toledo HO, Conrad JH, Wilkinson N, Martín FG. Estudio de la nutrición mineral de los bovinos para carne del este de las provincias de Chaco y Formosa (Argentina). Vet Arg. 1989; VI: 584-594.

20. Bavister BD. Interactions between embryos and the culture milieu. Theriogenology. 2000; 53: 619-626.

21. Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. Experientia. 1994; 50 (7): 626-640.

22. Benoff S. Preliminaries to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. Hum Reprod. 1993; 8(12): 2001-2006.

23. Bernardis AC, Roig CA, Bennasar Vilches M. Productividad y calidad de los Pajonales de Sorghastrum setosum (Griseb.) Hitchc. en Formosa, Argentina. Agric Téc. 2005; 65(2): 177-185. [Online].

24. Besecker BY, Exline MC, Hollyfield J, Phillips G, Disilvestro RA, Wewers MD, Knoell DL. A comparison of zinc metabolism, inflammation, and disease severity in critically ill infected and noninfected adults early after intensive care unit admission. Am J Clin Nutr. 2011; 93(6):1356-1364.

25. Bettger WJ, O'Dell B. A Critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. Life Sci. 1981; 28(13): 1425-1438.

26. Bilaspuri GS, Babbar BK. Effect of albumin and zinc on capacitation and acrosome reaction of buffalo spermatozoa. Indian J Anim Sci. 2007; 77: 688–692.

27. Black DH, French NP. Effects of three types of trace element supplementation on the fertility of three commercial dairy herds. Vet Rec. 2004; 154(21): 652-658.

28. Blazak WF, Overstreet JW. Instability of nuclear chromatin in the ejaculated spermatozoa of fertile men. J Reprod Fertil. 1982; 65: 331–339.

29. Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P. Zinc and Its Role in Immunity and Inflammation. Autoimmun Rev. 2015; 14(4): 277-285.

30. Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC, Brown RH, Jr, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. Proc Natl Acad Sci. 1994; 9 (17): 8292–8296.

31. Bowers GN, McComb RB. Measurement of Total Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum. Clin Chem. 1975; 21(13): 1988-1995.

32. Brekken A, Steinnes E. Seasonal concentrations of cadmium and zinc in native pasture plants: consequences for grazing animals. Sci Total Environ. 2004; 326(1-3): 181-195.

33. Bremner I, Young BW, Mills CF. Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in sheep. Br J Nutr. 1976; 36(3): 551-561.

34. Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. Zinc in plants. New Phytol. 2007; 173(4): 677-702.

35. Budde AM, Sellins K, Lloyd KE, Wagner JJ, Heldt JS, Spears JW, Engle TE. Effect of zinc source and concentration and chromium supplementation on performance and carcass characteristics in feedlot steers. J Anim Sci. 2019 Mar; 97(3): 1286-1295.

36. Buffarini MA, Minatel L, Cseh S. Variaciones Estacionales de minerales en sangre en dos rodeos de cría en el partido de General Villegas. Memoria Técnica, INTA. 2008; 88-92.

37. Campbell DM. Trace element needs in human pregnancy. Proc Nutr Sot. 1988; 47: 45- 53.

38. Carrillo J. Manejo de un Rodeo de Cría. Décima Reimpresión. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2007.

39. Ceko MJ, Hummitzsch K, Bonner WM, Aitken JB, Spiers KM, Rodgers RJ, Harris HH. Localization of the Trace Elements Iron, Zinc and Selenium in Relation to Anatomical Structures in Bovine Ovaries by X-Ray Fluorescence Imaging. Microsc Microanal.2015; 21(3): 695-705.

40. Chirase NK, Hutcheson DP, Thompson GB. Feed intake, rectal temperature, and serum mineral concentrations of feedlot cattle fed zinc oxide or zinc methionine and challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. J Anim Sci. 1991; 69(10): 4137-4145.

41. Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ y col. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. Science. 2008; 319(5865): 962-965.

42. Coria ML, Cseh SB, Fernández EL. Diagnóstico de deficiencias minerales en un campo del partido de Guaminí, Buenos Aires. Rev Arg Prod Anim. 2013; 33(1): 25.

43. Costa EF, Fazzio LE, Traveria GE, Sanchez RO, Alvarado Pinedo MF, y col. Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. Rev Med Vet. 2004; 85: 16-22.

44. Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. J Biol Chem. 2006; 281(34): 24085 - 24089.

45. Coutinho da Silva MA, Seidel GE, Squires EL, Graham JK and Carnevale EM. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. Reproduction. 2012; 143: 577–585.

46. Cseh S, Crenovich H, Fay P, Olmos G, Drake M. Valor Nutritivo de Pasturas en Campos del Este de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. XXV Jornadas

Uruguayas de Buiatría. IX Congreso Latinoamericano de Buiatría. Paysandú; 1997; p 29-30.

47. Cseh S, Ridao M, San Martino S, Drake M, Yarrar M. Valores serológicos de hierro y zinc en distintas categorías de bovinos hembra. Vet Mex. 1998; 29(1): 23-27.
48. Daugherty SR, Carstens GE, Herd DB, Barling KS, Randel RD. Effects of prenatal and prebreeding trace mineral/vitamin e injections on calf health and reproductive performance of beef cows. Beef Cattle Research in Texas. Texas A&M. Univ., College Station. 2002; p 39–43.
49. Davey BG, Mitchell RL. The distribution of trace elements in cocksfoot (Dactylis glomerata) at flowering. J Sci Food Agric. 1968; 19: 425–431.
50. de la Mata JJ, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Bosolasco D, de Brun V, Meikle A, Bó GA, Menchaca A. Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. Reprod Fertil Dev. 2018; 30(11): 1541-1552.
51. Deuster PA, Dolev E, Bernier LL, Trostmann UH. Magnesium and zinc status during the menstrual cycle. Am J Obstet Gynecol. 1987; 154: 964-968.
52. Dorostkar K, Alavi Shoushtari SM, Khaki A. Effects of In Vitro Zinc Sulphate Additive to The Semen Extender on Water Buffalo (Bubalusbubalis) Spermatozoa before and after Freezing. Int J Fertil Steril. 2014; 8(3): 325–332.
53. Dufty JH, Bingley JB, Cove LY. The plasma zinc concentration of nonpregnant, pregnant and parturient Hereford cattle. Aust Vet J. 1977; 53(11): 519-522.
54. Eggert Kruss W, Zwick EM, Batschulat K, Rohr G, Armbruster FP, Petzoldt D, Strowitzki T. Are zinc level in seminal plasma associated with seminal leukocyte and other determinant of semen quality. Fertil Steril. 2002; 17: 260–269.

55. Engle TE, Nockels CF, Kimberling CV, Weaber DL, Johnson AB. Zinc repletion with organic or inorganic forms of zinc and protein turnover in marginally zinc-deficient calves. J Anim Sci. 1997; 75(11): 3074-3081.

56. Enjalbert F, Lebreton P, Salat O. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2006; 90(11-12): 459-466.

57. Erskine RJ, Bartlett PC. Serum concentrations of copper, iron, and zinc during Escherichia coli-induced mastitis. J Dairy Sci. 1993; 76(2): 408-413.

58. Fajt VR, Apley MD, Roth JA, Frank DE, Brogden KA, Skogerboe TL, Shostrom VK, Chin YL. The effects of danofloxacin and tilmicosin on neutrophil function and lung consolidation in beef heifer calves with induced Pasteurella (Mannheimia) haemolytica pneumonia. J Vet Pharmacol Ther. 2003; 26(3): 173-179.

59. Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men's Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization. J Reprod Infertil. 2018; 19(2): 69-81.

60. Faverin C, Machado C. Tipologías y caracterización de sistemas de cría bovina de la pampa deprimida. Chilean J Agric Anim Sci. 2019; 35(1): 3-13.

61. Fazeli AR, Steenweg W, Bevers Mvan den Broek J, Bracher V, Parlevliet J and Colenbrander B. Relation between stallion sperm binding to homologous hemizonae and fertility. Theriogenology. 1995; 44: 751–760.

62. Fazzio LE, Landoni MF. Comparación de la eficacia de oxitetraciclina y tilmicosina en el tratamiento metafiláctico de la enfermedad respiratoria bovina en animales de feedlot. Analecta Vet. 2010; 30(2): 35-40.

63. Fazzio LE, Costa EF, Valera AR, Quiroga MA, Galosi CM. Brote de meningoencefalitis por herpes virus bovino tipo 5 en un engorde a corral. VII

Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE). Buenos Aires, del 6 al 8 de julio de 2010.

64. Forde N, Beltman ME, Duffy GB, Duffy P, Mehta JP, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P, Crowe MA. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: Effect of low circulating concentrations of progesterone and consequences for conceptus elongation. Biol Reprod. 2011; 84: 266–278.
65. Forde N, Mehta JP, Minten M, Crowe MA, Roche JF, Spencer TE, Lonergan P. Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. Biol Reprod. 2012; 87: 124.
66. Galarza EM, Lizarraga R, Anchordoquy JP, Fazzio LE, Anchordoquy JM. Efecto del zinc sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos. XX Congreso de Ciencias Morfológicas 18vas Jornadas De Educación en Ciencias Morfológicas. La Plata, 29 y 30 de octubre de 2020 (enviado para su publicación).
67. Galarza EM, Lizarraga RM, Streitenberger N, Arriaga G, Abraham G, Mattioli GA, Anchordoquy JM, Fazzio LE. Assessment of Plasma Zinc and Total Leukocyte Count in Calves Experimentally Infected With Mannheimia Haemolytica. Biol Trace Elem Res. 2020. [Online].
68. Gallaher D, Hurley LS. Low Zinc Concentration in Rat Uterine Fluid After 4 Days of Dietary Deficiency. J Nutr. 1980; 110 (3): 591–593.
69. Galvan WR, Yacachury N, Streitenberger N; Quiroga MA; Fazzio LE. Lesiones anatomopatológicas de bovinos en engorde a corral de un de un de un establecimiento de la provincia de Buenos Aires. Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires 2014.
70. Gammoh NZ, Rink L. Zinc in Infection and Inflammation. Nutrients. 2017; 9(6). pii: E624.

71. Ganda EK, Bisinotto RS, Vasquez AK, Teixeira AGV, Machado VS, Foditsch C. Effects of injectable trace mineral supplementation in lactating dairy cows with elevated somatic cell counts. J Dairy Sci. 2016; 99(9): 7319-7329.

72. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. Biol Reprod. 1994; 50: 390–400.

73. Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. J Reprod Fertil. 1988; 84: 437–446.

74. Genther-Schroeder ON, Hansen SL. Effect of a multielement trace mineral injection before transit stress on inflammatory response, growth performance, and carcass characteristics of beef steers. J Anim Sci. 2015; 93(4): 1767-1779.

75. Genther-Schroeder ON, Branine ME, Hansen SL. Effects of increasing supplemental dietary Zn concentration on growth performance and carcass characteristics in finishing steers fed ractopamine hydrochloride. J Anim Sci. 2018; 96(5): 1903-1913.

76. Givens D, Owen E, Axford RFE, Omed HM. Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CABI Publishing. 2000; p 345-371.

77. Gladstones JS, Loneragan JF. Mineral elements in temperate crop and pasture plants. I. Zinc. Aust J Agric Res. 1966; 18(3): 427-446.

78. Goff JP, Stabel JR. Decreased plasma retinol, alpha-tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. J Dairy Sci. 1990; 73(11): 3195-3199.

79. Gómez, L. Adopción de tecnología de la cría de carne vacuna en la cuenca del Salado. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina. 2015. [Online].

80. González-Maldonado J, Rangel-Santos R, Rodríguez-de Lara R, García-Peña O. Effect of injectable trace mineral complex supplementation on development of ovarian structures and serum copper and zinc concentrations in over-conditioned Holstein cows. Anim Reprod Sci. 2017; 181: 57-62.

81. Graham TW, Thurmond MC, Gershwin ME, Picanso JP, Garvey JS, Keen CL. Serum zinc and copper concentrations in relation to spontaneous abortion in cows: implications for human fetal loss. J Reprod Fertil. 1994; 102(1): 253-262.

82. Green MP, Hunter MG, Mann GE. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. Anim Reprod Sci. 2005; 88: 179–189.

83. Grippo AA, Henault MA, Anderson SH, Killian GJ. Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. J Dairy Sci. 1992; 75: 58-65.

84. Hansard SL, Mohammed AS. Maternal-Fetal Utilization of Zinc by Sheep. J Anim Sci. 1968; 27(3): 807–813.

85. Hashemi M. Heavy metal concentrations in bovine tissues (muscle, liver and kidney) and their relationship with heavy metal contents in consumed feed. Ecotoxicol Environ Saf. 2018; 154: 263-267.

86. Herdt TH, Hoff B. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2011; 27(2): 255-283.

87. Hill GM, Ku PK, Miller ER, Ullrey DE, Losty TA, O'Dell BL. A copper deficiency in neonatal pigs induced by a high zinc maternal diet. J Nutr. 1983; 113(4): 867-872.

88. Ho E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. J Nutr Biochem. 2004; 15 (10): 572-578.

89. Hoodbhoy T and Dean J. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. Reproduction. 2004; 127: 417–422.

90. Houghton PL, Lemenager RP, Horstman LA, Hendrix KS, Moss GE. Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. J Anim Sci. 1990; 68: 438-446.

91. Hugentobler SA, Morris DG, Sreenan JM, Diskin MG. Ion concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in the bovine. Theriogenology. 2007; 68(4): 538-548.

92. Hurley LS. The roles of trace elements in foetal and neonatal development. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1981; 294(1071): 145-152.

93. Ibs KH, Rink L. Zinc-altered Immune Function. J Nutr. 2003; 133(5): 1452-1456.

94. Ióvine E, Selva AA. El laboratorio en la clínica: metodología analítica, fisiopatología e interpretación semiológica. 3ra edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Médica Panamericana, 1985.

95. Ivanova M and Mollova M. Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. Theriogenology. 1993; 40: 397–410.

96. Junus MA, Cox FR. A Zinc Soil Test Calibration Based upon Mehlich 3 Extractable Zinc, pH, and Cation Exchange Capacity. Soil Sci Soc Am J. 1987; 51(3): 678-683.

97. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. Physiol Rev. 2015; 95(3): 749-784.

98. Kawaguchi S, Sakumoto R, Okuda K. Induction of the expressions of antioxidant enzymes by luteinizing hormone in the bovine corpus luteum. J Reprod Dev. 2013; 59 (3):219-224.

99. Kawakami E, Takemura A, Sakuma M, Takano M, Hirano T, Hori T, y col. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. J Vet Med Sci. 2007; 69: 133-136.

100. Kenyon AG, Mendonca LGD, Lopes G, Lima JR, Santos JEP, Chebel RC. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. Anim Reprod Sci. 2012; 136:223–230.

101. Kerns K, Zigo M, Sutovsky P. Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. Int J Mol Sci. 2018a; 19 (12). pii: E4097.

102. Kerns K, Zigo M, Drobnis EZ, Sutovsky M, Sutovsky P. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. Nat Commun. 2018b; 9(1): 2061.

103. Kessler J, Morel I, Dufey P, Gutzwiller A, Stern A, Geyer H. Effect of organic zinc sources on performance, zinc status and carcass, meat and claw quality in fattening bulls. Livest Prod Sci. 2003; 81(2–3): 161-171.

104. Kincaid RL, Chew BP, Cronrath JD. Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: effects on uptake and immunity. J Dairy Sci. 1997; 80(7): 1381-1388.

105. Kincaid R. Assessment of trace mineral status of ruminants: a review. Proc Am Soc Anim Sci. 1999; 77(1): 1–10.

106. King JC, Shames DM, Lowe NM, Woodhouse LR, Sutherland B, Abrams SA, Turnlund JR, Jackson MJ. Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men. Am J Clin Nutr. 2001; 74: 116–124.

107. King JC. Zinc: an essential but elusive nutrient. Am J Clin Nutr. 2011; 94(2): 679-684.

108. Kumar N, Verma RP, Singh LP, Varshney VP, Dass RS. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen

attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (Bos indicus x Bos taurus) bulls. Reprod Nutr Dev. 2006; 46(6): 663-675.

109. Kumar P, Sait SF. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. J Hum Reprod Sci. 2011; 4(1): 2-7.

110. Kynast G, Saling E. The relevance of zinc in pregnancy. J Perinat Med. 1980; 8: 171- 182.

111. Lee SR. Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. Oxid Med Cell Longev. 2018; 2018: 9156285. [Online].

112. Levaot N, Hershfinkel M. How Cellular Zn Signaling Drives Physiological Functions. Cell Calcium. 2018; 75: 53-63.

113. Li S, Winuthayanon W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. J Endocrinol. 2017; 232(1): R1-R26.

114. Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. Annu Rev Nutr. 2009; 29: 153-176.

115. Lindskog S. Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. Pharmacol Ther. 1997; 74(1): 1-20.

116. Liu D-Y, Sie B-S, Liu M-L, Agresta F, Baker HWG. Relationship between seminal plasma zinc concentration and spermatozoa–zona pellucida binding and the ZP-induced acrosome reaction in subfertile men. Asian J Androl. 2009; 11: 499–507.

117. Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, Ganz T, Cousins RJ. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. Proc Nat Acad Sci. 2005; 102(19): 6843-6848.

118. Lohuis JA, Van Leeuwen W, Verheijden JH, Van Miert AS, Brand A. Effect of dexamethasone on experimental Escherichia coli mastitis in the cow. J Dairy Sci. 1988; 71(10): 2782-2789.

119. Maes D, Lopez-Rodriguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Soom AV. Artificial insemination in pigs. In: Manafi M, editor. Artificial insemination in farm animals. Rijeka, Croatia: InTech. 2011; p 87-94.

120. Malcolm-Callis KJ, Duff GC, Gunter SA, Kegley EB, Vermeire DA. Effects of supplemental zinc concentration and source on performance, carcass characteristics, and serum values in finishing beef steers. J Anim Sci. 2000; 78(11): 2801-2808.

121. Mankad M, Sathawara NG, Doshi H, Saiyed HN, Kumar S. Seminal plasma zinc concentration and alpha-glucosidase activity with respect to semen quality. Biol Trace Elem Res. 2006; 110(2): 97-106.

122. Mann GE, Lamming GE, Fray MD. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. Anim Reprod Sci. 1995; 37: 121–131.

123. Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. Reproduction. 2001; 121: 175–180.

124. Maresca S, Quiroz García JL, Plorutti F. Eficiencia Reproductiva en Rodeos de Cría de la Cuenca del Salado. Publicaciones Regionales INTA. 2011.

125. Masters DG, Somers M. Zinc status of grazing sheep: Seasonal changes in zinc concentration in plasma, wool and pasture. Aust J Exp Agr. 1979; 20(102): 20-24.

126. Mattioli GA. Caracterización de la hipocuprosis bovina en el Partido de Magdalena (Provincia de Buenos Aires). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 1998.

127. Mattioli GA, Rosa DE, Turic E, Relling AE, Galarza EM, Fazzio LE. Effects of Copper and Zinc Supplementation on Weight Gain and Hematological Parameters in Pre-weaning Calves. Biol Trace Elem Res. 2018; 185(2): 327-331.

128. Mattioli GA. Nutrición Mineral y Vitamínica de Bovinos. 2da Edición. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 2019a.

129. Mattioli GA, Rosa DE, Turic E, Testa JA, Lizarraga RM, Fazzio LE. Effect of Injectable Copper and Zinc Supplementation on Weight, Hematological Parameters, and Immune Response in Pre-weaning Beef Calves. Biol Trace Elem Res. 2019b; 189(2): 456-462.

130. McCall KA, Huang CC, Fierke CA. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. J Nutr. 2000; 130: 1437-1446.

131. McNeill RE, Diskin MG, Sreenan JM, Morris DG. Associations between milk progesterone concentrations on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. Theriogenology. 2006; 65: 1435–1441.

132. McNeilly AS, Fraser HM. Effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. J Endocrinol. 1987; 115(2): 273-282.

133. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. J Reprod Fertil. 1992; 95: 755-763.

134. Michailov Y, Ickowicz D, Breitbart H. Zn2+-stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation. Dev Biol. 2014; 396 (2): 246-255.

135. Micheloud JF Suárez VH, Martínez GM, Rosa DE, Ventura MB, Mattioli GA. Niveles séricos de minerales en hembras de cría bovina en un establecimiento de la región de selva y pastizal pedemontano del norte de Salta. Revista FAVE. 2017; 16: 97-100.

136. Middleton JR, Luby CD, Viera L, Tyler JW, Casteel S. Short communication: influence of Staphylococcus aureus intramammary infection on serum copper, zinc, and iron concentrations. J Dairy Sci. 2004; 87(4): 976-979.

137. Miller JK, Miller WJ. Experimental zinc deficiency and recovery of calves. J Nutr. 1962; 76: 467-474.

138. Minatel L, Buffarini MA, Scarlata EF, Dallorso ME, Carfagnini JC. Niveles de cobre, hierro, zinc y selenio de bovinos del noroeste de la provincia de Buenos Aires. Rev Arg Prod Anim. 2004; 24(3-4): 225-235.

139. Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación, Subsecretaría de Ganadería. Caracterización de la Producción Bovina. Sistema de Monitoreo del Sector de la Carne Bovina. 2015. Disponible en https:// inta.gob.ar/sites/default/files/inta_caracterizacion_de_la_produccion_bovina.pdf.

140. Ministerio de Obras Públicas. Atlas de Cuencas y Regiones Hídricas Superficiales de la República Argentina. 2010. [Online] https://www.argentina.gob.ar/obras-publicas/hidricas/cartografia-hidrica-provincial.

141. Montano MF, Plascencia A, Salinas-Chavira J,Torrentera N, Zinn RA. Influence of level and form of supplemental zinc on feedlot growth performance and carcass characteristics of calf-fed Holstein steers. Prof Ani Sci. 2017; 33(6): 651-658.

142. Naber TH, Baadenhuysen H, Jansen JB, van den Hamer CJ, van den Broek W. Serum alkaline phosphatase activity during zinc deficiency and long-term inflammatory stress. Clin Chim Acta. 1986; 249(1-2): 109-127.

143. National Research Council (NRC). Nutrient requirements of beef cattle, eighth revised edition: update 2016. The National Academies Press, Washington, DC. 2016; p 129–130.

144. Ndebele N, Mtimuni JP, Mpofu ID, Makuza S, Mumba P. The status of selected minerals in soil, forage and beef cattle tissues in a semi-arid region of Zimbabwe. Trop Anim Health Prod. 2005; 37(5): 381-393.

145. Némoz JP, Giancola SI, Bruno MS, de la Vega MB, Calvo S, Di Giano S, Rabaglio MD. Causas que afectan la adopción de tecnología en la ganadería bovina para carne de la Cuenca del Salado: enfoque cualitativo. Estudios socioeconómicos de la adopción de tecnología. Nº 5. INTA. 2013.

146. Némoz JP. Principales características de la actividad ganadera vacuna en el área de la EEA Cuenca del Salado. Informe INTA-RIAN. 2013. Disponible en https://inta.gob.ar/documentos/principales-caracteristicas-de-la-actividad-ganadera-vacuna-en-elarea-de-la-eea-cuenca-del-salado.

147. Nicholas DJD. Trace Elements in Soil-Plant-Animal Systems. 1ra Edición. Glen Osmond, Australia. Ed Academic Press. 1975; p 109:134.

148. Nishimura R, Komiyama J, Tasaki Y, Acosta TJ, Okuda K. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. Biol Reprod. 2008; 78(3): 529-536.

149. Noda Y, Ota K, Shirasawa T, Shimizu T. Copper/Zinc Superoxide Dismutase Insufficiency Impairs Progesterone Secretion and Fertility in Female Mice. Biol Reprod. 2012; 86:16: 1–8.

150. Noffsinger T, Lukasiewicz K, Hyder L. Feedlot Processing and Arrival Cattle Management. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2015; 31(3): 323-340.

151. Nunnery GA, Vasconcelos JT, Parsons CH, Salyer GB, Defoor PJ, Valdez FR, Galyean ML. Effects of source of supplemental zinc on performance and humoral immunity in beef heifers. J Anim Sci. 2007; 85(9): 2304-2313.

152. Olds D, Vandemark NL. Composition of luminal fluids in bovine female genitalia. Fertil Steril. 1957; 8(4): 345–354.

153. Olechnowicz J, Tinkov A, Skalny A, Suliburska J. Zinc Status Is Associated With Inflammation, Oxidative Stress, Lipid, and Glucose Metabolism. J Physiol Sci. 2018; 68(1): 19-31.

154. Olson PA, Brink DR, Hickok DT, Carlson MP, Schneider NR, Deutscher GH, Adams DC, Colburn DJ, Johnson AB. Effects of supplementation of organic and

inorganic combinations of copper, cobalt, manganese, and zinc above nutrient requirement levels on postpartum two-year-old cows. J Anim Sci. 1999; 77(3): 522-532.

155. Omu AE, Al-Azemi MK, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA, Mathew TC. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. Med Princ Pract. 2008; 17(2): 108-116.

156. Orr CL, Hutcheson DP, Grainger RB, Cummins JM, Mock RE. Serum copper, zinc, calcium and phosphorus concentrations of calves stressed by Bovine Respiratory Disease and Infectious Bovine Rhinotracheitis. J Anim Sci 1990; 68: 2893-2900.

157. Osorio NW. pH del suelo y disponibilidad de nutrientes. Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal. 2012; 1(4): 1-4.

158. Otondo J. Efectos de la introducción de especies megatérmicas sobre características agronómicas y edáficas de un ambiente halomórfico de la Pampa Inundable. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. 2004.

159. Perdomo JT, Shirley RL, Chicco CF. Availability of Nutrient Minerals in Four Tropical Forages Fed Freshly Chopped to Sheep. J Anim Sci. 1977; 45(5): 1114-1119.

160. Picco SJ, Anchordoquy JM, de Matos DG, Anchordoquy JP, Seoane A, Mattioli GA, Errecalde AL, Furnus CC. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. Theriogenology. 2010; 74 (7): 1141-1148.

161. Pieper L, Schmidt F, Müller AE, Staufenbiel R. Zinc concentrations in different sample media from dairy cows and establishment of reference values. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere. 2017; 45(4): 213-218.

162. Piper HG, Higgins G. Estimation of trace metals in biological material by atomic absorption spectrophotometry. Proc Assoc Clin Biochem. 1967; 7: 190–195.

163. Pittaluga Rossi AM. Minerales en Campo Natural: Variación Estacional y por Sitio Geográfico del Contenido de Fósforo, Cobre, Manganeso, Zinc, Hierro y Selenio. Tesis de Maestría. Universidad de La República, Montevideo, Uruguay. 2018.

164. Pitts WJ, Miller WJ, Fosgate OT, Morton JD, Clifton CM. Effect of zinc deficiency and restricted feeding from two to five months of age on reproduction in Holstein bulls. J Dairy Sci. 1966; 49(8): 995-1000.

165. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. J Nutr. 2000; 130 (5S Suppl): 1447S-1454S.

166. Prabowo A, McDowell LR, Wilkinson NS, Wilcox CJ, Conrad JH. Mineral status of grazing cattle in south sulawesi, Indonesia: Microminerals. Asian Austral J Anim. 1991; 4(2): 121-130.

167. Rabiee AR, Lean IJ, Stevenson MA, Socha MT. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: a meta-analysis. J Dairy Sci. 2010; 93(9): 4239-4251.

168. Ramírez CE, Mattioli GA, Giuliodori MJ, Yano H, Matsui I. Deficiencia de Zn en bovinos de cría de la provincia de Buenos Aires. Vet Argent. 1998; 15(142): 114–118.

169. Ray CS, Singh B, Jena I, Behera S, Ray S. Low Alkaline Phosphatase (ALP) In Adult Population an Indicator of Zinc (Zn) and Magnesium (Mg) Deficiency. Curr Res Nutr Food Sci. 2017; 5(3): 347-352.

170. Revell SG, Mrode RA. An osmotic resistance test for bovine semen. Anim Reprod Sci. 1994; 36: 77-86.

171. Rhinehart JD, Starbuck-Clemmer MJ, Flores JA, Milvae RA, Yao J, Poole DH, Inskeep EK. Low peripheral progesterone and late embryonic/early fetal loss in suckled beef and lactating dairy cows. Theriogenology. 2009; 71(3): 480-490.

172. Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 2007; 8(2): 117–128.

173. Riffo M, Leiva S, Astudillo J. Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. Int J Androl. 1992; 15(3): 229-237.

174. Robson AD. Zinc in Soils and Plants. Proceedings of the International Symposium on 'Zinc in Soils and Plants'. University of Western Australia. 1993; p 59-71.

175. Rojas MC, Vázquez PM, Verdier M, Noseda R. Componentes del paisaje que favorecen la aparición de carbunco en la Pampa Deprimida (provincia de Buenos Aires, Argentina). Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2011; 30(3): 897-909.

176. Rosa DE, Fazzio LE, Picco SJ, Furnus CC, Mattioli GA. Metabolismo y deficiencia de zinc en bovinos. Analecta Vet. 2008; 28: 34-44.

177. Rossanigo CE, Arano A, Rodriguez Vázquez G. Stock 2012 del ganado bovino. Mapas de Existencias e indicadores ganaderos. Información Técnica N° 187. EEA INTA San Luis. 2012.

178. Sahawneh MA, Ricart KC, Roberts BR, Bomben VC, Basso M, Ye Y, Sahawneh J, Franco MC, Beckman JS, Estévez AG. Cu,Zn-superoxide dismutase increases toxicity of mutant and zinc-deficient superoxide dismutase by enhancing protein stability. J Biol Chem. 2010; 285(44): 33885-33897.

179. Sakaguchi S, Iizuka Y, Furusawa S, Ishikawa M, Satoh S, Takayanagi M. Role of Zn^{2+} in oxidative stress caused by endotoxin challenge. Eur J Pharmacol. 2002; 451(3): 309-316.

180. Scarpati OE, Capriolo AD. Sequías e inundaciones en la provincia de Buenos Aires (Argentina) y su distribución espacio-temporal. Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM. 2013; 82: 38-51.

181. Schapiro JM, Libby SJ, Fang FC. Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(14): 8496-8501.

182. Sekler I, Sensi SL, Hershfinkel M, Silverman WF. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. Mol Med. 2007; 13(7-8): 337-343.

183. SENASA. Indicadores de Ganadería Bovina. 2015. [Online]. http://www.senasa.gob.ar/prensa/DNSA/Control_Gestion_y_Programas_Especiales/Indicadores_ganaderos/1_Indicadores_Ganaderia_Bovina/Ganaderia_Bovina.html.

184. Sheikh AA, Aggarwal A, B I, Aarif O. Inorganic zinc supplementation modulates heat shock and immune response in heat stressed peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows. Theriogenology. 2017; 95: 75-82.

185. Sheikh G, Masood Q, Majeed S, Hassan I. Comparison of levels of serum copper, zinc, albumin, globulin and alkaline phosphatase in psoriatic patients and controls: A hospital based case control study. Indian Dermatol. 2015; 6(2): 81-83.

186. Siciliano-Jones JL, Socha MT, Tomlinson DJ, DeFrain JM. Effect of trace mineral source on lactation performance, claw integrity, and fertility of dairy cattle. J Dairy Sci. 2008; 91(5): 1985-1995.

187. Simmer K, Thompson RPH. Zinc in the fetus and newborn. Acta Paediatr Scand Suppl. 1985; 319: 158-163.

188. Sims JT, Johnson GV. 1991. Micronutrient soil tests. In micronutrients in agriculture (Book series 4). Ed. SSSA Madison, Winsconsin, USA. 1991; p 427-476.

189. Snook RB, Brunner MA, Saatman RR, Hansel W. The Effect of Antisera to Bovine LH in Hysterectomized and Intact Heifers. Biol Reprod. 1969; 1 (1): 49–58.

190. Solomons NW. On the assessment of zinc and copper nutriture in man. Am J Clin Nutr. 1979; 32(4): 856-871.

191. Soltesova H, Nagyova V, Tothova C, Nagy O. Haematological and blood biochemical alterations associated with respiratory disease in calves. Acta Vet BRNO. 2015; 84: 249–256.

192. Sorensen MB, Bergdahl IA, Hjollund NH, Bonde JP, Stoltenberg M, Ernst E. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. Mol Hum Reprod. 1999; 5(4): 331-337.

193. Spears JW, Kegley EB. Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. J Anim Sci. 2002; 80(10): 2747-2752.

194. Spears JW. Zinc methionine for ruminants: relative bioavailability of zinc in lambs and effects of growth and performance of growing heifers. J Anim Sci. 1989; 67(3): 835-843.

195. Stephenson JL, Brackett BG. Influences of zinc on fertilisation and development of bovine oocytes in vitro. Zygote. 1999; 7: 195–201.

196. Streitenberger N, Ferella A, Pérez Aguirreburualde MS, Sammarruco A, Dus Santos MJ, Mozgovoj M, Maidana S, Romera A, Pecora A, Quiroga MA, Fazzio LE. Complejo respiratorio bovino: estudio virológico longitudinal en un establecimiento de engorde a corral de la provincia de Buenos Aires, Argentina. XLIV Jornadas Buiatria; Paysandú, Uruguay. 2016.

197. Stronge AJ, Sreenan JM, Diskin ME, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. Post-insemination milk progesterone concentrations and embryo survival in dairy cows. Theriogenology. 2005; 64: 1212–1224.

198. Suttle NF. Mineral Nutrition of Livestock, 4th Edition. Oxfordshire, UK. 2010; p 426–458.

199. Swain PS, Rao SBN, Rajendran D, Dominic G, Selvaraju S. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. Anim Nutr. 2016; 2(3): 134-141.

200. Swanson CA, King JC . Zinc and pregnancy outcome. Am J Clin Nutr. 1987; 46: 763-771.

201. Swelum AA, Saadeldin IM, Abdelnour SA, Ba-Awadh H, Abd El-Hack ME, Sheiha AM. Relationship between concentrations of macro and trace elements in serum and follicular, oviductal, and uterine fluids of the dromedary camel (Camelus dromedarius). Trop Anim Health Prod. 2020; 52(3): 1315-1324.

202. Swenerton H, Hurley LS. Zinc deficiency in rhesus and bonnet monkeys, including effects on reproduction. J Nutr. 1980; 110(3): 575-583.

203. Tamura T, Goldenberg RL. Zinc nutriture and pregnancy outcome. Nutr Res. 1996; 16(1): 139-181.

204. Taneja SK, Kaur R. Pathology of ovary, uterus, vagina and gonadotrophs of female mice fed on Zn-deficient diet. Indian J Exp Biol. 1990; 28 (11): 1058-1065.

205. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. Biomed Pharmacother 2003; 57(9):399-411.

206. Tian X, Zheng Y, Li Y, Shen Z, Tao L, Dou X, Qian J, Shen H. Psychological stress induced zinc accumulation and up-regulation of ZIP14 and metallothionein in rat liver. BMC Gastroenterol. 2014; 18: 14:32.

207. Tom JW, Pierson RA, Adams GP. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. Theriogenology. 1998; 49(7): 1345-1352.

208. Tyler G, Olsson T. Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. Plant and Soil. 2001; 230: 307–321.

209. Underwood EJ, Suttle NF. The mineral nutrition of livestock. CABI Publishing; London (UK). 1999.

210. Ungerfeld E. Factores que afectan el contenido de minerales en pasturas naturales y el estado nutricional de vacunos y ovinos en Uruguay. INIA Tacuarembó – Revisión Minerales. 1998; p 184-208.

211. Valdes-Ramos R. Zinc: A perinatal point of view. Prog Food Nutr Sci. 1992; 16: 279-306.

212. Vallee BL, Falchuk KH. The Biochemical Basis of Zinc Physiology. Physiol Rev. 1993; 73(1): 79-118.

213. Van Bibber-Krueger CL, Vahl CI, Narayanan SK, Amachawadi RG, Taylor EA, Scott HM, Drouillard JS. Effects of supplemental zinc sulfate on growth performance, carcass characteristics, and antimicrobial resistance in feedlot heifers. J Anim Sci. 2019; 97(1): 424-436.

214. Vanegas JA, Reynolds J, Atwill ER. Effects of an injectable trace mineral supplement on first-service conception rate of dairy cows. J Dairy Sci. 2004; 87(11): 3665-3671.

215. Vázquez P, Rojas MC, Burges JC. Caracterización y tendencias de la ganadería bovina en la cuenca del salado. Vet Argent. 2008; 25(248): 572-584.

216. Villa Elizaga I, da Cunha Ferreira RMC. Zinc, Pregnancy and parturition. Acta Paediatr Scand. 1985; suppl 319: 150-7.

217. Weems YS, Lammoglia MA, Vera-Avila HR, Randel RD, King C, Sasser RG, Weems CW. Effect of luteinizing hormone (LH), PGE2, 8-EPI-PGE1, 8-EPI-PGE2, trichosanthin, and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of progesterone in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cows. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 1998; 55(1): 27-42.

218. Weismann K, Høyer H. Serum alkaline phosphatase and serum zinc levels in the diagnosis and exclusion of zinc deficiency in man. Am J Clin Nutr. 1985; 41(6): 1214-1219.

219. Williams RB, McDonald I, Bremner I. The Accretion of Copper and of Zinc by the Foetuses of Prolific Ewes. Br J Nutr. 1978; 40(2): 377-386.

220. Wrightt CL, Spears JW. Effect of zinc source and dietary level on zinc metabolism in Holstein calves. J Dairy Sci. 2004; 87(4): 1085-1091.

221. Wu J, Wu S, Xie Y, Wang Z, Wu R, Cai J, Luo X, Huang S, You L. Zinc protects sperm from being damaged by reactive oxygen species in assisted reproduction techniques. Reprod Biomed. 2015; 30(4): 334-339.

222. Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Håård MG and Rodriguez-Martinez H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen–thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. Int J Androl. 1999; 22: 253–260.

223. Zhang JH, Yu J, Li WX, Cheng CP. Evaluation of Mn2+ stimulated and Zn2+ inhibited apoptosis in rat corpus luteal cells by flow cytometry and fluorochromes staining. Chin J Physiol. 1998; 41(2): 121-126.

224. Zini A, Fischer MA, Mak V, Phang D, Jarvi K. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. Urol Res. 2002; 30: 321-323.