

## BIOPATOLOGÍA DE LA CARENCIA DE CINC EXPERIMENTAL EN OVEJA<sup>1</sup>

### Biopathology of the experimental chronic lack of zinc in sheep

García Partida, P.\*, Gutiérrez Panizo, C.\*\* y Alonso de Vega, F. D.\*\*\*

\* Departamento de Patología General Médica y de la Nutrición.

\*\* Departamento de Patología General Médica y de la Nutrición. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

\*\*\* Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Recibido: 27 abril

#### RESUMEN

Se estudia la biopatología de la carencia de cinc experimental, en ovejas de raza Manchega, mediante la comparación entre un grupo sometido a una dieta carencial, 20 ppm, y otro, control, que recibió la misma dieta con 60 ppm.

En el estudio hematológico realizado, se ha observado una disminución de los eritrocitos en los animales carentes  $8.270.000 \pm 71.100/\text{mm}^3$  con respecto a los testigos,  $9.225.000 \pm 66.120/\text{mm}^3$ , sin mostrar variaciones apreciables en cuanto al número de leucocitos, concentración de hemoglobina y valor del hematocrito.

En la fórmula leucocitaria, los animales carentes presentan una linfocitopenia,  $32'5 \pm 0'9\%$ , frente a los testigos,  $48'11 \pm 1'7\%$ , al igual que una ligera eosinofilia y monocitosis, y una marcada neutrofilia  $54'5 \pm 1'03\%$  en el lote carente, frente a los animales del grupo testigo,  $41'9 \pm 1'6\%$ .

La glucemia de los animales carentes, disminuye considerablemente,  $34'6 \pm 0'33 \text{ mg}/100 \text{ ml.}$ , con respecto a los testigos,  $50'6 \pm 0'49 \text{ mg}/100 \text{ ml.}$

La lipemia, aumenta en los animales que recibieron la dieta carencial, al igual que la bilirrubina, tanto la total como la directa.

Las proteínas séricas totales no sufren variaciones, y en el ferograma sérico sólo se aprecia un ligero descenso de la fracción albúmina en los animales carentes.

La actividad de la enzima GOT, en el suero, se eleva considerablemente en los animales carentes,  $71'6 \pm 1'32 \text{ U/L}$  frente a los testigos  $44'9 \pm 0'72 \text{ U/L.}$ , y la fosfatasa alcalina presenta unos valores de  $37'1 \pm 0'75 \text{ U. KA}$  y  $45'4 \pm 0'8 \text{ U. KA}$ , en carentes y testigos respectivamente. La colinesterasa, los minerales, Ca, P, Mg y los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , no sufren variaciones entre ambos lotes de animales.

La concentración de cinc en el suero, fue menor en los animales carentes,  $1'5 \pm 0'02 \text{ ppm}$  que en los testigos,  $1'9 \pm 0'03 \text{ ppm}$ , en el suero desproteinizado y en el suero sin desproteinizar, los valores fueron igualmente inferiores en los animales carentes que los testigos, con cifras de  $0'65 \pm 0'01$  y  $0'8 \pm 0'01$  respectivamente.

**Palabras clave:** Carencia crónica, cinc, oveja.

#### SUMMARY

Biopathology of experimental lack of zinc in Manchega sheep has been studied, comparing a group which received a semisynthetic diet with a content of zinc of 20 ppm, and a control group, with the same diet but with 60 ppm of zinc.

<sup>1</sup> Trabajo extraído de la Tesis Doctoral «Carencia crónica experimental de cinc en oveja», realizada por F. D. Alonso de Vega, Univ. de León, 1984.



In a haematologic study it is observed a diminishing of the flowing erythrocytes in the lacking animals,  $8.270.000 \pm 71.100/\text{mm}^3$ , with regard to the control ones,  $9.225.000 \pm 66.120/\text{mm}^3$ . No variation in the number of leukocytes, concentration of haemoglobin and value of the haematocryte was found.

Leukocytary formula of the lacking animals showed a lymphocytopeny,  $32.5 \pm 0.9\%$  whereas the control ones showed  $48.11 \pm 1.7\%$ , remarkable neutrophily  $54.5 \pm 1.03\%$  versus  $41.9 \pm 1.6\%$ , and a slight eosinophily and an increase of monocytes.

Glycemia in the lacking animals decreases considerably,  $34.6 \pm 0.33 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ . with respect to the control ones  $50.6 \pm 0.49 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ .

Lipohaemia in the lacking animals increases as well as bilirubins total and direct.

Serous proteins do not suffer any variations between both groups and only the albumin fraction decreases slightly in the lacking animals.

Activity of GOT enzyme in the serum rises in the lacking animals,  $71.6 \pm 1.32 \text{ U/L}$  in contrast to control ones,  $44.9 \pm 0.72 \text{ U/L}$ ., whereas alkaline phosphatase decreases in the lacking animals,  $37.1 \pm 0.75 \text{ U.KA}$ , with regard to control ones,  $45.4 \pm 0.8 \text{ U. LA}$ . Cholinesterase, minerals Ca, P, Mg, and ions  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  do not present any variations between the both groups of animals.

Concentration of zinc in the un proteinized serum is lower in the lacking animals,  $1.5 \pm 0.02 \text{ ppm}$ . than in the control ones,  $1.9 \pm 0.03 \text{ ppm}$ . Equally, in the serum which has not been unproteinized, contents in zinc decreases from  $0.65 \pm 0.01 \text{ ppm}$ . to  $0.8 \pm 0.01 \text{ ppm}$ ., in lacking and control animals respectively.

**Keywords:** Chronic lack. Zinc. Sheep.

## INTRODUCCIÓN

El cinc es un elemento que entra a formar parte de las membranas celulares, contribuyendo a su estabilidad (9, 10), inhibiendo la lisis de los glóbulos rojos (3, 8, 54), siendo fijado en su mayor parte por la anhidrasa carbónica (7, 8, 21). Así, cualquier variación que sufran los valores de cinc en la sangre, tienen una repercusión directa sobre la cantidad de eritrocitos circulantes. También se encuentra en los glóbulos blancos (7, 53), a nivel de la membrana, y en los gránulos citoplasmáticos, y disminuye en todas aquellas enfermedades que afectan a los leucocitos (26, 53).

El cinc interviene en la síntesis de proteínas (17), al igual que en la de ácidos nucleicos (16), y la carencia del oligoelemento ocasiona efectos teratógenos, defectos del crecimiento y del desarrollo de los órganos (17, 43).

Por otra parte, se encuentra interviniendo en numerosas actividades enzimáticas, formando parte de la molécula de anhidrasa carbónica (29), de las carboxipeptidasas pancreáticas (11, 13, 34), de la fosfatasa alcalina (42) y en más de 80 cinc-metaloenzimas (6, 44, 48).

La molécula de insulina tiene igualmente cinc, y existe de otro lado una marcada interrelación entre los ácidos grasos y el contenido de cinc de la ración (3, 7, 45, 51).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se han utilizado 50 ovejas de raza Manchega, todas hembras adultas, divididas en dos lotes, uno de los cuales recibió una dieta semisintética con un contenido en cinc de 20 ppm., cantidad suficiente-

mente baja como para provocar una carencia de cinc (31, 35, 37), determinándose este valor por espectrofotometría de absorción atómica. El lote de animales testigos, recibió la misma dieta con un suplemento adicional de cinc, hasta alcanzar las 60 ppm.

Cada 15 días extraemos sangre de la yugular, 20 c.c., 5 de los cuales se heparinizaron, utilizándose para la realización de un análisis morfológico sanguíneo, donde se determinó el número de glóbulos rojos y blancos, hematocrito, hemoglobina, siguiendo las técnicas usuales (12, 50), y la fórmula leucocitaria mediante una tinción May Grünwald-Giemsa, haciendo la diferenciación celular sobre 200 células contadas.

El resto de la sangre se destinó para la obtención de suero, el cual, después de ser extraído se congeló a  $-20^\circ \text{C}$ ., para ulteriores determinaciones, transaminasas, fosfatasa, colinesterasa, glucosa, lípidos totales, bilirrubina, proteínas totales, ferograma sérico.

Igualmente determinamos diversos minerales, Calcio, Fósforo, Magnesio, por fotocolorimetría, así como los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , por fotometría de llama. El cinc sérico se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (41), tanto en el suero desproteinizado como no desproteinizado (15, 25).

Los datos obtenidos se sometieron a un estudio estadístico (52), haciendo una comparación de medias, mediante la «t» de Student.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque la eritrocitemia en ambos lotes de animales se encuentra dentro de los límites normales para esta especie (12,50), hay una marcada diferencia entre los animales testigos y

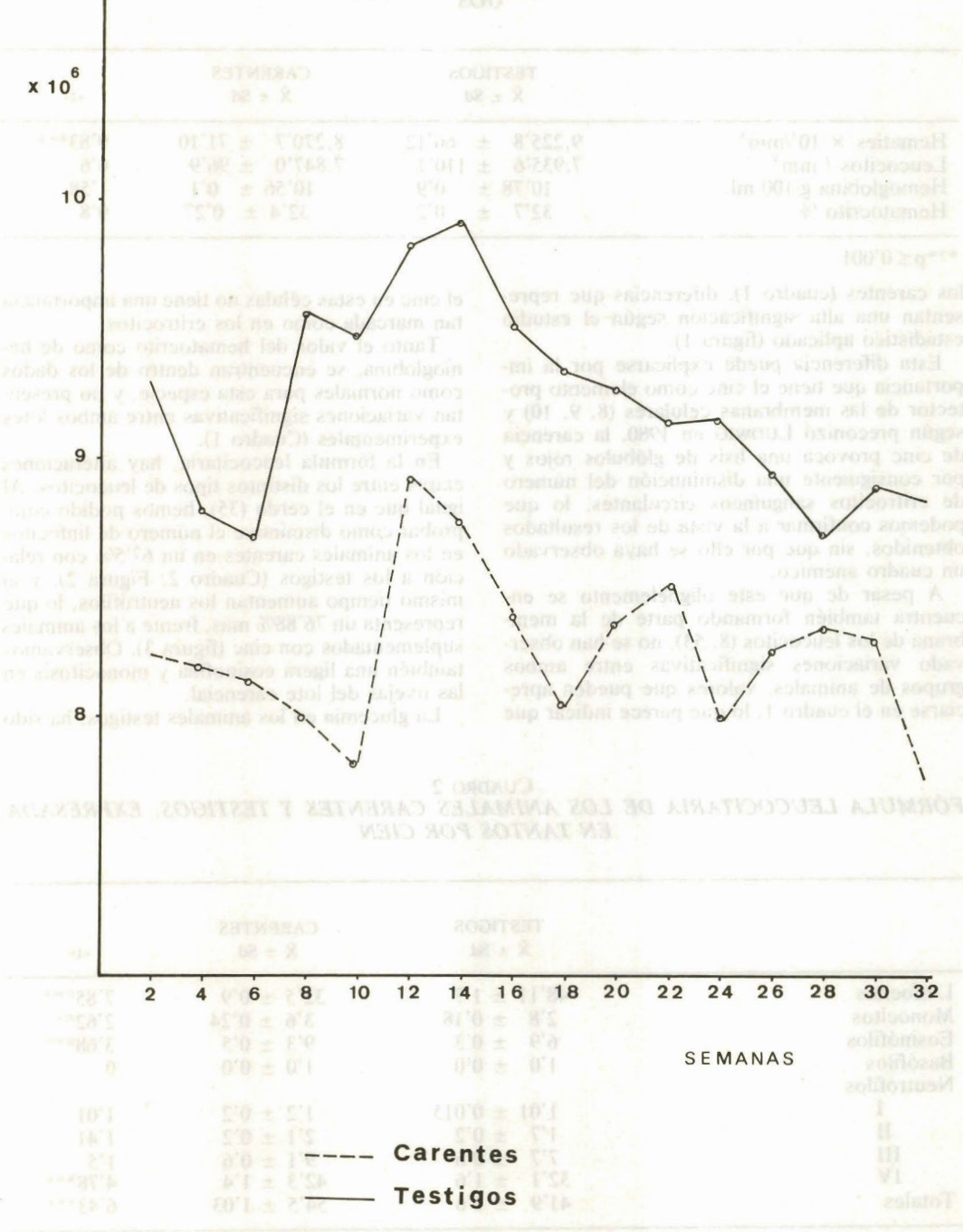


FIGURA 1. Variación del número de hematies a lo largo de la experiencia.

\*\* p < 0.01  
\*\*\* p < 0.001



CUADRO 1  
VALORES MEDIOS DEL CUADRO HEMÁTICO DE LOS ANIMALES CARENTES Y TESTIGOS

	TESTIGOS $\bar{X} \pm Sd$	CARENTES $\bar{X} \pm Sd$	$\langle t \rangle$
Hematíes $\times 10^3/mm^3$	9.225'8 $\pm$ 66'12	8.270'7 $\pm$ 71'10	9'83***
Leucocitos / $mm^3$	7.935'6 $\pm$ 110'1	7.847'0 $\pm$ 96'9	0'6
Hemoglobina g/100 ml.	10'78 $\pm$ 0'9	10'56 $\pm$ 0'1	1'58
Hematocrito %	32'7 $\pm$ 0'2	32'4 $\pm$ 0'27	0'8

\*\*\* $p \leq 0'001$

los carentes (cuadro 1), diferencias que representan una alta significación según el estudio estadístico aplicado (figura 1).

Esta diferencia puede explicarse por la importancia que tiene el cinc como elemento protector de las membranas celulares (8, 9, 10) y según preconizó LUDWIG en 1980, la carencia de cinc provoca una lisis de glóbulos rojos y por consiguiente una disminución del número de eritrocitos sanguíneos circulantes, lo que podemos confirmar a la vista de los resultados obtenidos, sin que por ello se haya observado un cuadro anémico.

A pesar de que este oligoelemento se encuentra también formando parte de la membrana de los leucocitos (8, 53), no se han observado variaciones significativas entre ambos grupos de animales, valores que pueden apreciarse en el cuadro 1, lo que parece indicar que

el cinc en estas células no tiene una importancia tan marcada como en los eritrocitos.

Tanto el valor del hematocrito como de hemoglobina, se encuentran dentro de los datos como normales para esta especie, y no presentan variaciones significativas entre ambos lotes experimentales (Cuadro 1).

En la fórmula leucocitaria, hay alteraciones claras entre los distintos tipos de leucocitos. Al igual que en el cerdo (35), hemos podido comprobar cómo disminuye el número de linfocitos en los animales carentes en un 67'5% con relación a los testigos (Cuadro 2, Figura 2), y al mismo tiempo aumentan los neutrófilos, lo que representa un 76'88% más, frente a los animales suplementados con cinc (figura 3). Observamos también una ligera eosinofilia y monocitosis en las ovejas del lote carencial.

La glucemia en los animales testigos, ha sido

CUADRO 2  
FÓRMULA LEUCOCITARIA DE LOS ANIMALES CARENTES Y TESTIGOS, EXPRESADA EN TANTOS POR CIENTO

	TESTIGOS $\bar{X} \pm Sd$	CARENTES $\bar{X} \pm Sd$	$\langle t \rangle$
Linfocitos	48'11 $\pm$ 1'7	32'5 $\pm$ 0'9	7'85***
Monocitos	2'8 $\pm$ 0'18	3'6 $\pm$ 0'24	2'62**
Eosinófilos	6'9 $\pm$ 0'3	9'3 $\pm$ 0'5	3'68***
Basófilos	1'0 $\pm$ 0'0	1'0 $\pm$ 0'0	0
Neutrófilos			
I	1'01 $\pm$ 0'015	1'2 $\pm$ 0'2	1'01
II	1'7 $\pm$ 0'2	2'1 $\pm$ 0'2	1'41
III	7'7 $\pm$ 0'6	9'1 $\pm$ 0'6	1'5
IV	32'1 $\pm$ 1'6	42'3 $\pm$ 1'4	4'78***
Totales	41'9 $\pm$ 1'6	54'5 $\pm$ 1'03	6'43***

\*\*  $p \leq 0'01$

\*\*\*  $p \leq 0'001$

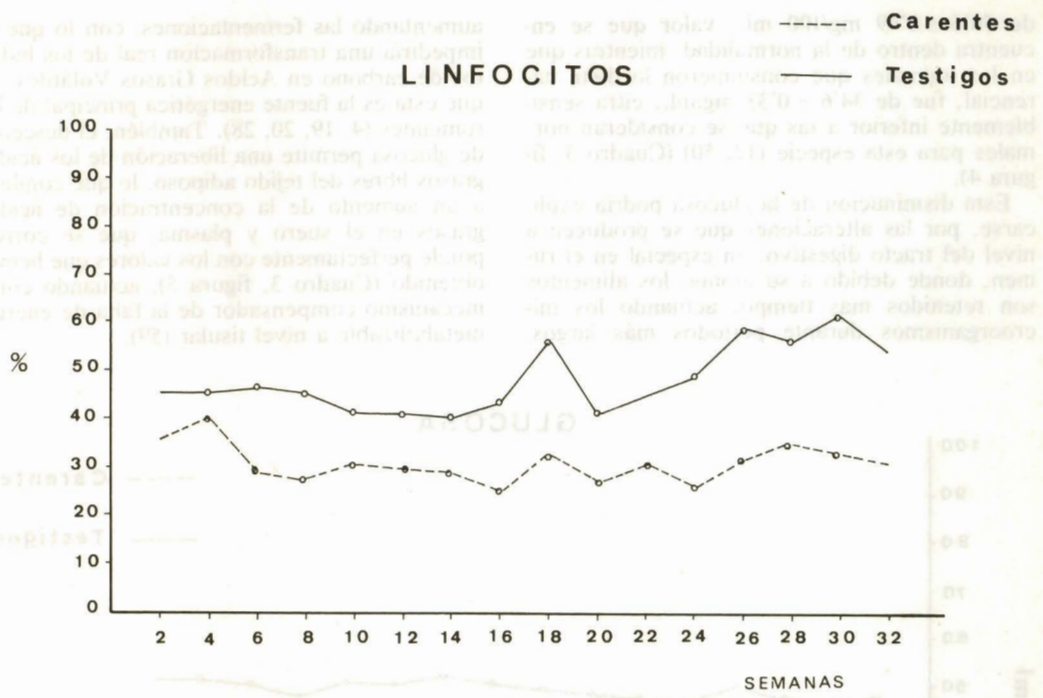


FIGURA 2. Oscilaciones de los linfocitos en los dos lotes de animales.

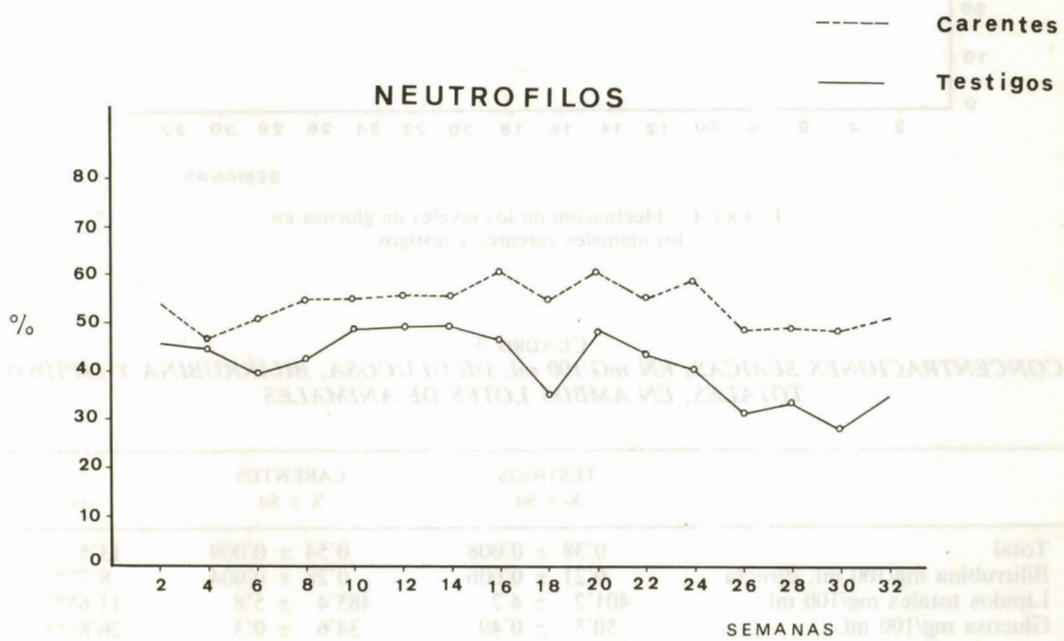


FIGURA 3. Variación de los neutrofilos a lo largo de toda la experiencia.

de  $50.6 \pm 0.49$  mg/100 ml., valor que se encuentra dentro de la normalidad, mientras que en los animales que consumieron la dieta carental, fue de  $34.6 \pm 0.33$  mg/ml., cifra sensiblemente inferior a las que se consideran normales para esta especie (12, 50) (Cuadro 3, figura 4).

Esta disminución de la glucosa podría explicarse, por las alteraciones que se producen a nivel del tracto digestivo, en especial en el rumen, donde debido a su atonía, los alimentos son retenidos más tiempo, actuando los microorganismos durante períodos más largos,

aumentando las fermentaciones, con lo que se impediría una transformación real de los hidratos de carbono en Acidos Grasos Volátiles, ya que ésta es la fuente energética principal de los rumiantes (4, 19, 20, 28). También, el descenso de glucosa permite una liberación de los ácidos grasos libres del tejido adiposo, lo que conlleva a un aumento de la concentración de ácidos grasos en el suero y plasma, que se corresponde perfectamente con los valores que hemos obtenido (Cuadro 3, figura 5), actuando como mecanismo compensador de la falta de energía metabolizable a nivel tisular (59).

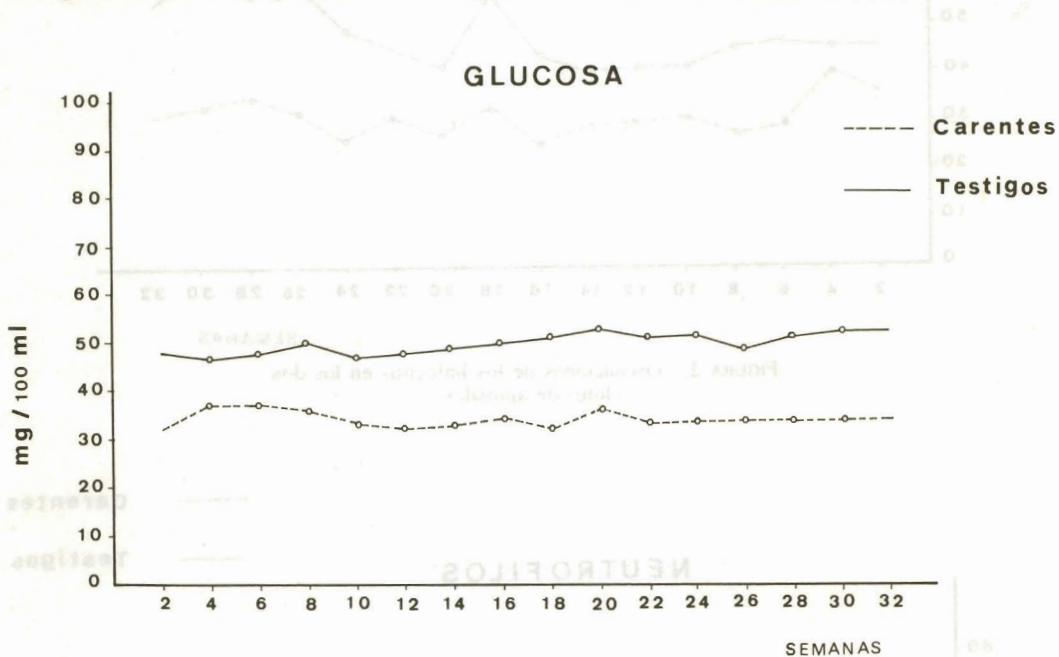


FIGURA 4. Fluctuación de los niveles de glucosa en los animales carentes y testigos.

CUADRO 3  
CONCENTRACIONES SÉRICAS, EN mg/100 ml. DE GLUCOSA, BILIRRUBINA Y LÍPIDOS TOTALES, EN AMBOS LOTES DE ANIMALES

	TESTIGOS $\bar{X} \pm Sd$	CARENTES $\bar{X} \pm Sd$	<t>
Total	$0.38 \pm 0.008$	$0.54 \pm 0.009$	13.5
Bilirrubina mg/100 ml. directa	$0.21 \pm 0.006$	$0.28 \pm 0.004$	8.7***
Lípidos totales mg/100 ml.	$401.2 \pm 4.2$	$485.4 \pm 5.8$	11.6***
Glucosa mg/100 ml.	$50.5 \pm 0.49$	$34.6 \pm 0.3$	26.8***

\*\*\*  $p \leq -0.001$



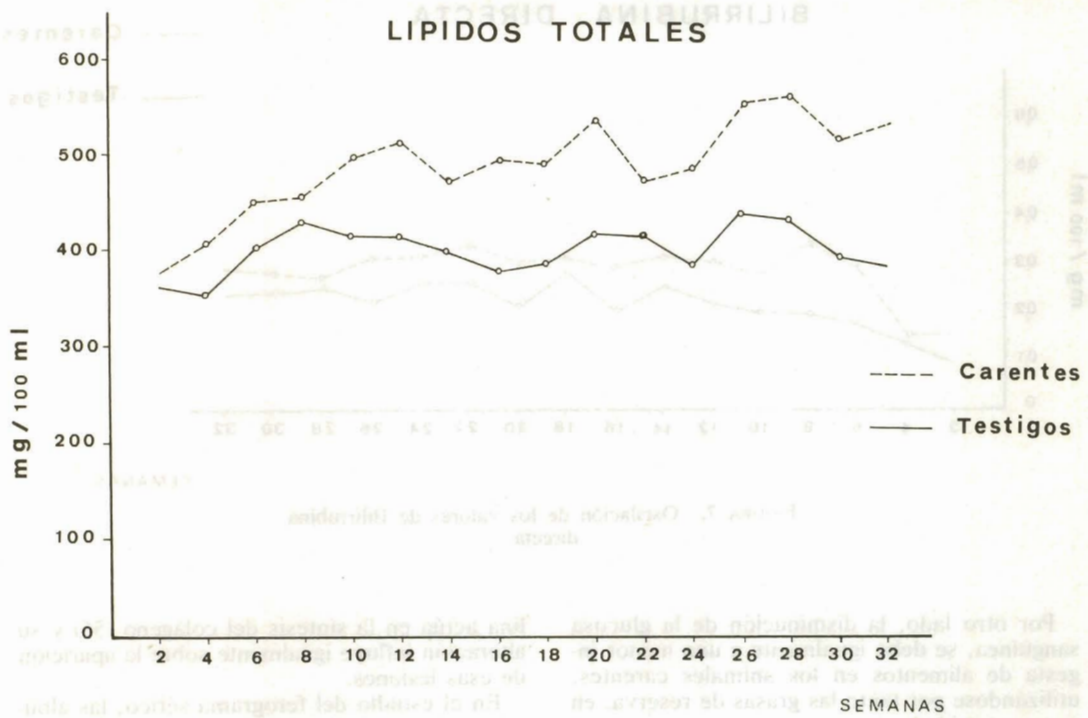


FIGURA 5. Variación de los niveles de lípidos totales.

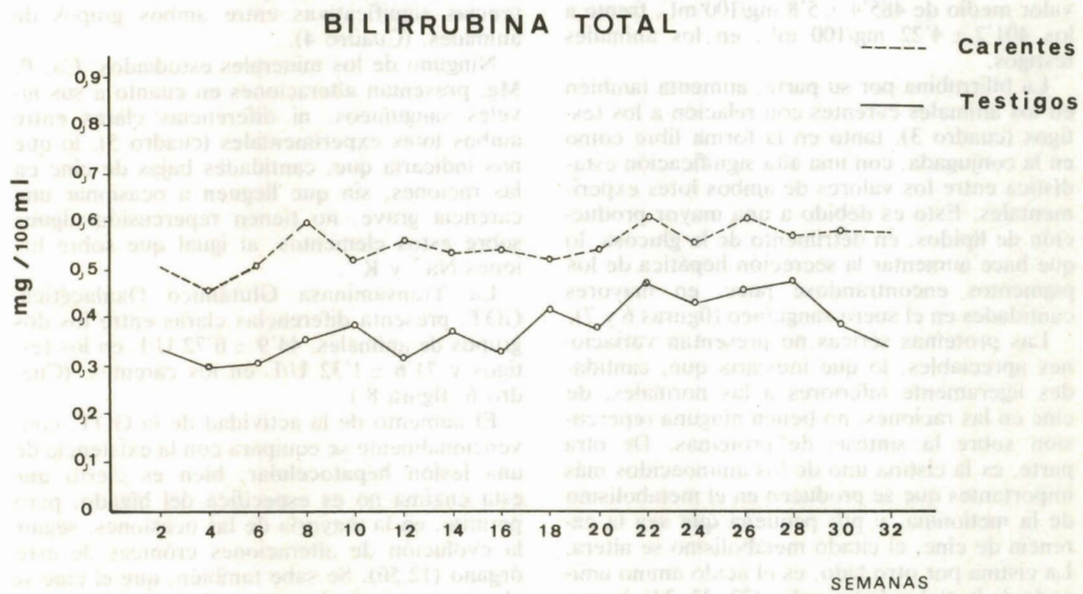


FIGURA 6. Fluctuación de la concentración de la bilirrubina total.

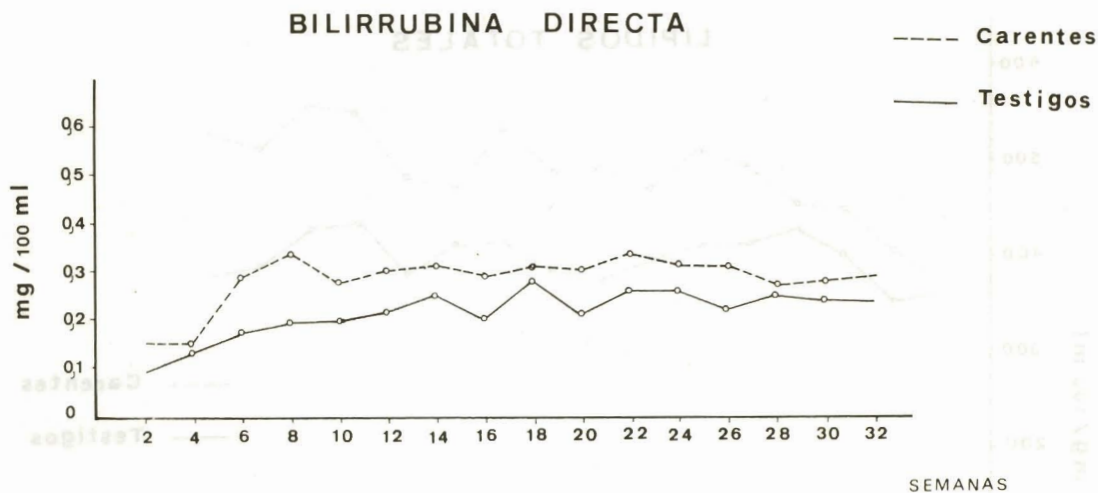


FIGURA 7. Oscilación de los valores de Bilirrubina directa.

Por otro lado, la disminución de la glucosa sanguínea, se debe igualmente a una menor ingesta de alimentos en los animales carentes, utilizándose por tanto las grasas de reserva, en mayor cantidad.

Esto podría explicarnos los niveles bajos de glucosa, que se corresponden con una elevación de la lipemia en los animales que consumieron la dieta carencial (Cuadro 3), con un valor medio de  $485.4 \pm 5.8$  mg/100 ml., frente a los  $401.2 \pm 4.22$  mg/100 ml., en los animales testigos.

La bilirrubina por su parte, aumenta también en los animales carentes con relación a los testigos (cuadro 3), tanto en la forma libre como en la conjugada, con una alta significación estadística entre los valores de ambos lotes experimentales. Esto es debido a una mayor producción de lípidos, en detrimento de la glucosa, lo que hace aumentar la secreción hepática de los pigmentos encontrándose pues, en mayores cantidades en el suero sanguíneo (figuras 6 y 7).

Las proteínas séricas no presentan variaciones apreciables, lo que indicaría que, cantidades ligeramente inferiores a las normales, de cinc en las raciones, no tienen ninguna repercusión sobre la síntesis de proteínas. De otra parte, es la cistina uno de los aminoácidos más importantes que se producen en el metabolismo de la metionina, y por pequeña que sea la carencia de cinc, el citado metabolismo se altera. La cistina por otro lado, es el ácido amino amado de la piel y de los pelos (22, 23, 24), lo que explicaría las lesiones dérmicas que aparecen en la carencia de cinc. También la hidroxipro-

lina actúa en la síntesis del colágeno (56) y su alteración influye igualmente sobre la aparición de esas lesiones.

En el estudio del ferograma sérico, las albúminas disminuyen ligeramente en los animales carentes frente a los testigos, ya que el cinc va unido a esta fracción proteica, y su menor ingesta origina una menor concentración de la fracción albúmina, aunque no se observan diferencias significativas entre ambos grupos de animales. (Cuadro 4).

Ninguno de los minerales estudiados, Ca, P, Mg, presentan alteraciones en cuanto a sus niveles sanguíneos, ni diferencias claras entre ambos lotes experimentales (cuadro 5), lo que nos indicaría que, cantidades bajas de cinc en las raciones, sin que lleguen a ocasionar una carencia grave, no tienen repercusión alguna sobre estos elementos, al igual que sobre los iones  $Na^+$  y  $K^+$ .

La Transaminasa Glutámico Oxalacética, GOT, presenta diferencias claras entre los dos grupos de animales,  $44.9 \pm 0.72$  U/L en los testigos y  $71.6 \pm 1.32$  U/L en los carentes. (Cuadro 6, figura 8.)

El aumento de la actividad de la GOT, convencionalmente se equipara con la existencia de una lesión hepatocelular; bien es cierto que esta enzima no es específica del hígado, pero permite, en la mayoría de las ocasiones, seguir la evolución de alteraciones crónicas de este órgano (12,50). Se sabe también, que el cinc se almacena principalmente en las células hepáticas (30, 32, 49, 58) donde se realizan funciones esenciales para el desarrollo celular. La dismi-



CUADRO 4  
**PROTEÍNAS SÉRICAS TOTALES Y FEROGRAMA SÉRICO  
 EN ANIMALES CARENTES Y TESTIGOS**

	TESTIGOS X̄ ± sd	CARENTES X̄ ± sd	<t>
Proteínas totales g/100 ml.	7'9 ± 0'04	8'0 ± 0'05	1'67
Albúmina %	39'03 ± 0'41	37'68 ± 0'58	1'89
Globulinas: %			
Alfa <sub>1</sub>	4'3 ± 0'16	4'8 ± 0'31	1'42
Alfa <sub>2</sub>	6'5 ± 0'33	6'4 ± 0'31	0'21
Alfa total	10'8 ± 0'37	11'2 ± 0'33	1'98*
Beta <sub>1</sub>	6'1 ± 0'31	6'1 ± 0'2	0'02
Beta <sub>2</sub>	9'7 ± 0'38	9'7 ± 0'44	0
Beta total	15'8 ± 0'37	15'8 ± 0'58	0
Gamma	34'3 ± 0'5	35'2 ± 0'44	1'33

\* p ≤ -0'05

CUADRO 5  
**CONCENTRACIÓN DE MINERALES E IONES EN EL SUERO DE LOS  
 ANIMALES DE LA EXPERIENCIA**

	TESTIGOS X̄ ± Sd	CARENTES X̄ ± Sd	<t>
Cálcio mg/100 ml.	9'9 ± 0'06	10'0 ± 0'06	1'09
Fósforo mg/100 ml.	9'0 ± 0'11	9'04 ± 0'11	0'248
Magnesio mg/100 ml.	1'7 ± 0'02	1'7 ± 0'01	0
Sodio mEq/l.	144'6 ± 0'39	146'3 ± 1'28	1'266
Potasio mEq/l.	5'8 ± 0'04	5'8 ± 0'03	0

CUADRO 6  
**ENZIMAS SÉRICAS EN LOS ANIMALES CARENTES Y TESTIGOS**

	TESTIGOS X̄ ± Sd	CARENTES X̄ ± Sd	<t>
Colinesterasa mg/100 ml.	1'034 ± 0'02	1'05 ± 0'02	1'49
G. O. T. U/L.	44'9 ± 0'72	71'6 ± 1'32	11'75***
Fosfatasa alcalina u. KA.	45'4 ± 0'8	37'1 ± 0'75	7'33

\*\*\* p ≤ -0'001

nación del cinc en la ración, ocasiona una mejor fijación y absorción intestinal del oligoelemento, y consiguientemente un menor transporte y almacenamiento posterior, por una disminución de la metalotionina transportadora (14, 27, 33, 40), ocasionada por una menor síntesis de cistina en el metabolismo de la metio-

nina (38, 39, 46), lo que provocaría alteraciones funcionales en las células de este órgano.

Los valores de colinesterasa no presentan variaciones significativas entre los dos lotes de animales (cuadro 6). Por el contrario, la Fosfatasa Alcalina, tiene una claras diferencias entre los animales testigos y los carentes (cuadro 6,

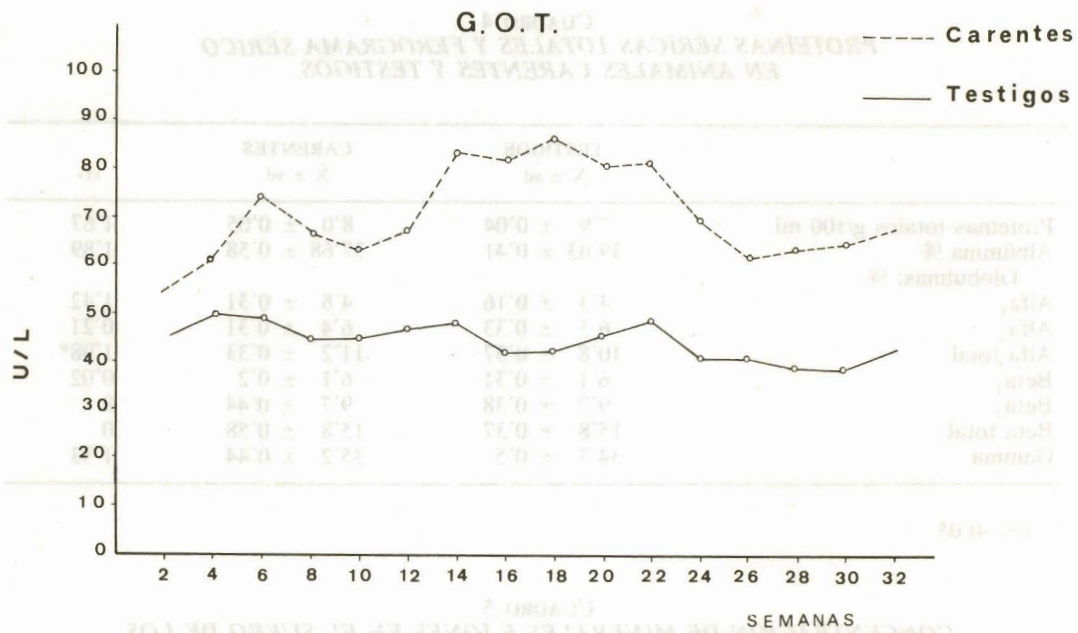


FIGURA 8. Variación de los niveles de GOT en el suero de ambos lotes de animales.

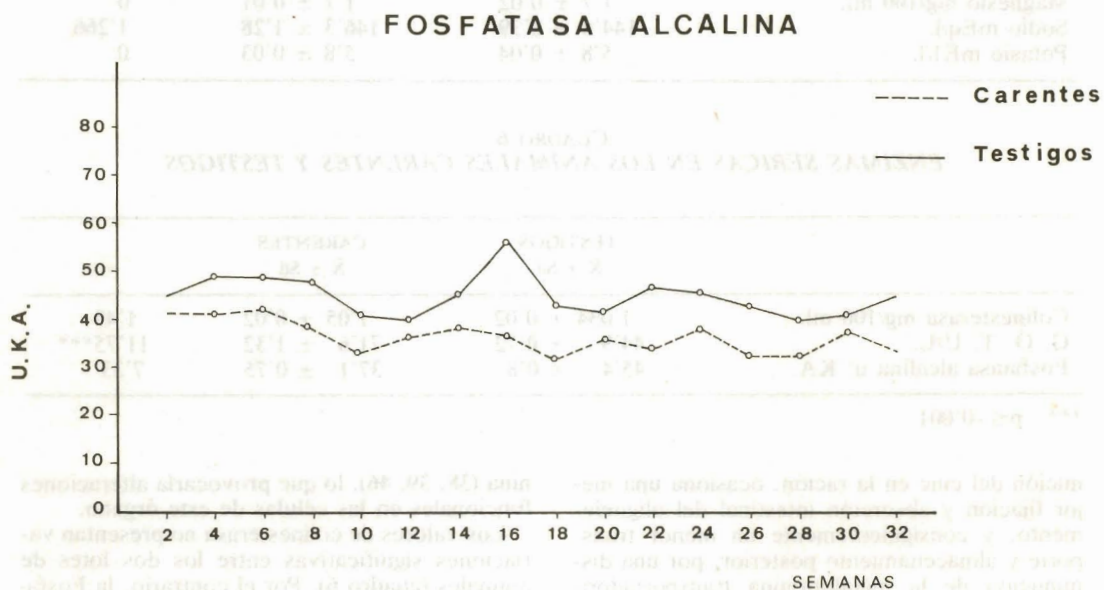


FIGURA 9. Fosfatasa alcalina sérica y sus oscilaciones a lo largo de la experiencia.



figura 9). La disminución de la actividad de esta enzima en los animales carentes, provoca la aparición de lesiones dérmicas, por actuar en la fabricación de los tejidos de sostén (4, 47, 55, 61), y esta falta de cinc impediría la activación de la enzima para que realice su función, y mantener íntegra la piel (1, 47, 55, 57).

El cinc sérico disminuye notablemente en los animales carentes frente a los testigos (cuadro

7), tanto cuando utilizamos la técnica de desproteinización como la de no desproteinización (2, 18, 36, 60) y como consideramos que los animales están exentos de parásitos, enfermedades infecciosas, y no se encuentran sometidos a ninguna acción estresante, esta disminución del oligoelemento sólo puede ser debida a un menor aporte de cinc en la dieta (figuras 10 y 11).

CUADRO 7  
CONCENTRACIÓN SÉRICA DEL CINCO EN AMBOS GRUPOS DE ANIMALES (ppm)

	TESTIGOS $\bar{X} \pm Sd$	CARENTES $\bar{X} \pm Sd$	<t>
Desproteinizado	1'9 $\pm$ 0'03	1'5 $\pm$ 0'02	10'1***
Sin desprotenizar	0'8 $\pm$ 0'01	0'65 $\pm$ 0'01	7'63***

\*\*\*  $p \leq 0'001$

Zn EN SUERO DESPROTEINIZADO CON T.C.A.

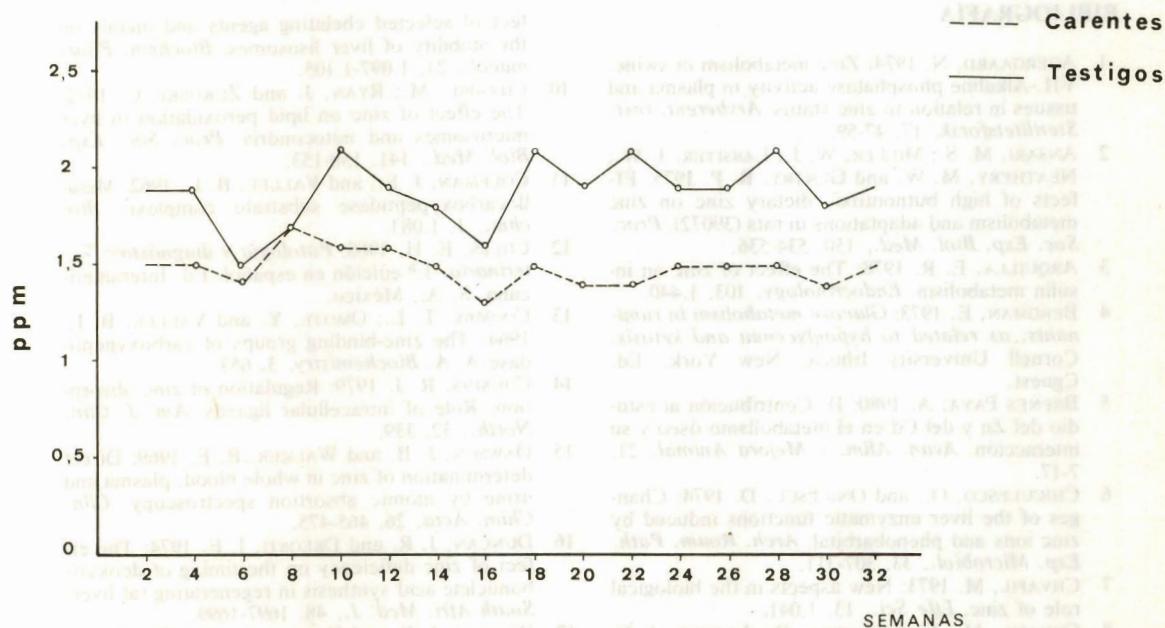


FIGURA 10. Valores del cinc en el suero desproteinizado y su variación en los animales carentes y testigos.

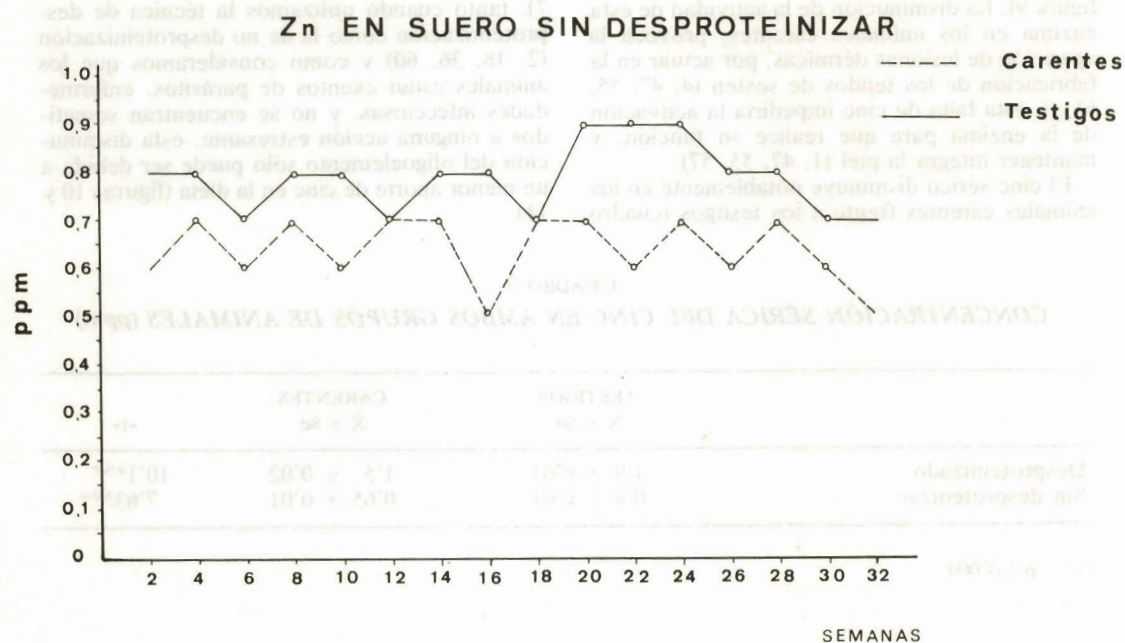


FIGURA 11. Concentración del cinc en el suero no desproteínizado a lo largo de la experiencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AGERGAARD, N. 1974: Zinc metabolism in swine. VII.-Alkaline phosphatase activity in plasma and tissues in relation to zinc status. *Arsberent. Inst. Sterilitetsforsk.*, 17, 47-59.
2. ANSARI, M. S.; MILLER, W. J.; LASSITER, J. W.; NEATHERY, M. W. and GENTRY, R. P. 1975. Effects of high but nontoxic dietary zinc on zinc metabolism and adaptations in rats (39072). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 150, 534-536.
3. ARQUILLA, E. R. 1978: The effect of zinc on insulin metabolism. *Endocrinology*, 103, 1.440.
4. BERGMAN, E. 1973: *Glucose metabolism in ruminants, as related to hypoglycemia and ketosis*. Cornell University Ithaca, New York, Ed. Cguest.
5. BRENES PAYA, A. 1980: II. Contribución al estudio del Zn y del Cd en el metabolismo óseo y su interacción. *Avan. Alim. y Mejora Animal*, 21, 7-17.
6. CHICULESCO, O., and ONICESCU, D. 1974: Changes of the liver enzymatic functions induced by zinc ions and phenobarbital. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 33, 307-311.
7. CHVAPIL, M. 1973: New aspects in the biological role of zinc. *Life Sci.*, 13, 1.041.
8. CHVAPIL, M.; MONTGOMERY, D.; LUDWIG, J. C. and ZUKOSKI, C. 1979: Zinc in erythrocyte ghost. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 162, 480-484.
9. CHVAPIL, M.; RYAN, J. and BRADA, Z. 1972: Effect of selected chelating agents and metals on the stability of liver lysosomes. *Biochem. Pharmacol.*, 21, 1.097-1.105.
10. CHVAPIL, M.; RYAN, J. and ZUKOSKI, C. 1972: The effect of zinc on lipid peroxidation in liver microsomes and mitochondria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 141, 150-153.
11. COLEMAN, J. E., and VALLEE, B. L. 1962. Metallo-carboxypeptidase substrate complex. *Biochim.*, 1, 1.083.
12. COLES, E. H. 1968: *Patología y diagnóstico Veterinario*. 1.ª edición en español. Ed. Interamericana, S. A., México.
13. COOMBS, T. L.; OMOTE, Y. and VALLEE, B. L. 1964: The zinc-binding groups of carboxypeptidase A. *Biochemistry*, 3, 653.
14. COUSINS, R. J. 1979: Regulation of zinc absorption: Role of intracellular ligands. *Am. J. Clin. North.*, 32, 339.
15. DAWSON, J. B. and WALKER, B. E. 1969: Direct determination of zinc in whole blood, plasma and urine by atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chim. Acta*, 26, 465-475.
16. DUNCAN, J. R. and DREOSTI, I. E. 1974: The effect of zinc deficiency on the timing of deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating rat liver. *South Afri. Med. J.*, 48, 1697-1699.
17. DUNCAN, J. R. and HURLEY, L. S. 1978: Thymidine kinase and DNA polymerase activity in normal and deficient developing rat embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 159, 39.



- 18 FURCHNER, J. E. and RICHMOND, C. R. 1962. Effects of dietary zinc on the absorption of orally administered Zn 65. *Health Phys.*, 8, 35.
- 19 HAUFMAN, C. y BERGMAN, E. 1971: Renalglucosis Free Fatty acid and ketone body metabolism in sheep. *Am. J. of Physiol* 221, n.º 4, 967-972.
- 20 HECKER, J. F. 1983; *The sheep as an experimental animal*. Academic Press, New York.
- 21 HOVE, E.; ELVEHEJEM, C. A. and HART, E. B. 1938: The relation of zinc to carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 136, 425.
- 22 HSU, J. M.; ANTHONY, W. L. and BUCHANAN, P. J. 1968: Incorporation of glycine C <sup>14</sup> into liver glutathione in zinc deficient rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 1.048.
- 23 —1969: Zinc deficiency of L-methionimeteheil C <sup>14</sup> in rats. *J. Nutr.*, 97, 279.
- 24 1969: Zinc deficiency and incorporation of C <sup>14</sup> labeled methionine into tissue proteins in rats. *J. Nutr.*, 99, 425.
- 25 JAMES; B. E. and MACMAHON, R. A. 1971: An effect of trichloroacetic acid on the determination of zinc by atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chim. Acta.*, 32, 307-309.
- 26 JOPEK, Z.; ZASZUBKIEWICZ, C and MADEJ, A. 1980: Heavy metals contents Zn, Cu, Cd, Pb, in the organs of cows with limphatic leukemia. *Arch. Exper. Vet. Med.*, Leipzig, 34, 221-225.
- 27 KAGI, J. H. R. and VALLEE, B. L. 1961: Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 236, 2.435-2.440.
- 28 KANEKO, J. and CORNELIUS, C. 1970: *Clinical biochemistry of domestic animals*. Ac. Press, New York, 40-52.
- 29 KEILIN, D. and MANN, T. 1940: Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.*, 34, 1.163.
- 30 KINCAID, R. L.; MILLER, W. J.; GENTRY, R. P.; NEATHERY, M. W. and HAMPTON, D. L. 1975: Intracellular distribution of Zn 65 in calves receiving high but non toxic amounts of zinc. *J. Dairy Sci.*, 59, 552-555.
- 31 LAMAND, M. 1974: Etiopathogenie des carences en oligoéléments dans les ensilages de maïs enrichis en urée et en soufre. *Ann. Rech. Vet.*, 5, 281-288.
- 32 LUDWIG, J. C. and CHVAPIL, M. 1980: Reversible stabilitationof liver lysosomes by zinc ions. *J. Nutr.*, 110, 945-953.
- 33 MARHOSHES, M. and VALLEE, B. L. 1975: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1813-1814.
- 34 MEZTLER, D. E. 1977: *Biochemistry*. The chemical reactions of living cell. Ac. Press, Iowa State University, pp. 378-979.
- 35 MILLER, J. K. and MILLER, W. J. 1960: Development of zinc deficiency in hostein calves fed a purified diet. *J. Dairy Sci.*, 43, 1854-1856.
- 36 MILLER, W. J. 1970: Zinc nutrition of cattle. A review. *J. Dairy Sci.*, 53, 1.123-1.135.
- 37 MILLS, C. F. and col. 1967: Zinc deficiency and zinc requirement of calves and lambs. *Br. J. Nutr.*, 21, 751.
- 38 NORDBERG, G. F.; NORDBERG, M.; PISCATOR, M. and VESTERBERG, O. 1972: Separation of two forms of rabbit metallothionein by isoelectric focusing. *Biochem. J.*, 126, 491-498.
- 39 OH, S. H.; DEAGEN, J. T.; WHANGER, P. D. and WESWIG, P. H. 1978: Biological function of metallothionein. IV. Biosynthesis and degradation of liver and kidney metallothionein in rats fed diets containing zinc and cadmium. *Bioinorg. Chem.*, 8, 245-254.
- 40 PALLAUF, J. and KIRCHGESSNER, M. 1971: Experimenteller zinkmangel bei wachsenden ratten. *Z. Tierphysiol. Tierenährg. u. Futtermittelkde*, 28, 129-139.
- 41 PERKIN-ELMER, 1976: *Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry*. Norwalk, Connecticut, U.S.A.
- 42 PLOCKE, D. J.; LEVINTHAL, L. and VALLEE, B. L. 1962: Alkaline phosphatase of *Escherichia coli*: A zinc metalloenzyme. *Biochem.*, 1, 373.
- 43 PRASAD, A. S. 1977: Zinc in human nutrition. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 8, 1-80.
- 44 PRASAD, A. S. and col., 1967: Studies of zinc deficiency changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc deficient rats. *J. Clin. Invest.*, 46, 549.
- 45 QUATERMAN, J. 1967: A role for zinc and chromium in the insukine stimulation of glucose uptake by adipose tissue. *Biochem. J.*, 102, 41.
- 46 RICHARDS, M. P. and COUSINS, R. J. 1976: Metallothioneins and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. *J. Nutr.*, 106, 1.591-1.599.
- 47 ROTH, H. P. and KIRCHGESSNER, M. 1979: Zur in vitro aktivierung der alkalischen phosphatasa im serum von unterschiedlichen mit zink versorgten ratten. *Zbl. Vet. Med. A.*, 26, 835-840.
- 48 RUBINI, M. E.; MONTALVO, G.; LOCKHART, C. P. and JOHNSON, C. R. 1961: Metabolism of Zn 65. *Amer. J. Physiol.*, 200, 1.345.
- 49 SAYLOR, W. W. and LEACH, R. M. Jr. 1980: Intracellular distribution of cooper and zinc in shepp: Effect of age and dietary levels of the metals. *J. Nutr.*, 110, 460-468.
- 50 SCHALM, O. W. 1964: *Hematología Veterinaria*. Unión tipográfica, Ed. Hispano Americana, México.
- 51 SLOOS, M. W. and KEMP, R. L. 1978: *Veterinary Clinical Parasitology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 52 SNEDECOR, G. W. y COCHRAN, W. G. 1971: *Métodos estadísticos aplicados a la investigación agrícola y biológica*. Cía. Ed. Cont., S. A., México.
- 53 SZMIGIELSKI, S. 1966: Hypothetical significance of disturbances of zinc and protoporphyrin metabolism in leukaemic cells. *Nature*, 209, 411-412.
- 54 TAKEDA, Y.; OGISO, Y., and MIWATINI, T. 1977: Effect of zinc ion on the hemolytic activity of thermostable direct hemolysin from vibrio parahaemolyticus, streptolysin 0 and Triton X-100. *Infect. Immunity.*, 17, 239-243.
- 55 TALJEDAL, I. B.; HELLMAN, B.; PETERSON, B. and HELLERSTROM, C. 1966: Effect of glucagon an the alkaline phosphatase activity in the pancreatic islets of rats. *Nature*, 209, 409-410.
- 56 THOMPSON, R. W. and GLIBREATH, R. L. 1976: Effects of zinc deficiency on swine skin collagen

and zinc. *Nutr. Rep. Intern.*, 13, 253.

57 TORTUERO, F. y BRENES, A. 1977: Estudio de diferentes niveles de cinc en la dieta sobre el proceso de osificación de los pollos. *Avan. Ali. Mej. Anim.*, 18, 19-24.

58 UNDERWOOD, E. J. 1977: *Trace elements in human and animal nutrition*. 4.<sup>a</sup> edición. Acad. Press, New York, 211-225.

59 WARNER, A. 1962: Production of volatile fatty acids in the rumen. *Nutr. Abstr. Rev.*, 34, 339-346.

60 WEISSNER, E. and MILLER, S.; 1974: *Veterinärmedizinische Pathogenetik Jena*, VEB Gustav Fischer Verlag, p. 458.

61 WIGTH, P. A. L. 1977: The ultrastructure of the interdigital web in experimental zinc deficiency of ducks. *Avian Path.*, 6, 111-124.