

## IMPORTANCIA DEL Zn EN LA REPRODUCCIÓN PORCINA

MVZ. M en C. Dra. en CV. Adelfa del C. García Contreras

LABIMA: Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. UAM-X

MVZ. Dra. en CV. Yasmin Gpe. De Loera Ortega

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM

### Introducción

El Zinc (Zn) es uno de los microminerales con mayor diferencia en los niveles recomendados para su uso. Después del hierro (Fe), el Zn es el micromineral más distribuido en el organismo, está asociado a problemas de paraqueratosis, caída de pelo, anorexia, aumento de lesiones en patas, disminución en el crecimiento corporal y en particular se asocia a menor desarrollo de los testículos, disminución de la respuesta inmune, cuando existe una deficiencia de este mineral. Sin embargo, no hay evidencia clara de los signos de toxicidad del Zn, ya que el organismo es muy eficiente para desechar el exceso de este mineral, pero se ha observado que consumir un alto nivel provoca daños colaterales como son signos o lesiones asociados a deficiencias de otros iones como el Cu, Ca y Fe.

El uso de fuentes de Zn con alto grado de biodisponibilidad (Orgánicas: Lisinato de Zn, Metionato de Zn, levaduras enriquecidas con Zn) ha sido una demanda de la industria alimenticia, no solo por los aspectos nutricionales, sino también por las exigencias legales de impedir que este micromineral sea excretado a través de las heces y orines, impactando negativamente al ambiente. Sumado a lo anterior, en las dos últimas décadas se ha incrementado el uso de la enzima fitasa en el alimento, la cual aumenta la disponibilidad biológica del Zn contenido en los ingredientes vegetales utilizados en la formulación de alimentos.

Por lo tanto, el uso de fuentes orgánicas, inclusión de fitasas y el aumento de los niveles (mg) de Zn, ha supuesto que las necesidades los cerdos no castrados y las hembras para reemplazo en las etapas de crecimiento-finalización se cubren día con día, alcanzando un desarrollo morfológico adecuado, estimando que su vida reproductiva futura será óptima. Sin embargo, esto habría que tomarlo con cautela, ya que hay evidencia que los mecanismos de control que median el transporte, almacenamiento y uso del Zn, como son las proteínas transportadoras ZnT, Zip, metalotioneina (MT) entre otras, pueden no ser capaces de soportar consumos elevados de Zn, provocando a nivel intracelular citotoxicidad evidenciada en daños en el ADN nuclear de las células.

## El Zn en la reproducción

Es interesante señalar que las principales diferencias nutricionales entre alimentos de hembras reproductoras y verracos se encuentran en los micronutrientes: vitaminas y minerales (Estienne y Harper, 2005).

La investigación del efecto nutricional principalmente de minerales sobre los valores reproductivos de los machos y las hembras es relativamente reciente y escasa por las dificultades de realizarla, debido al tiempo que se requiere para asegurar algún resultado. Aun con ello, es fundamental identificar el papel que juegan los minerales incluidos en las dietas, ya que estos son nutrientes esenciales, que se encuentran distribuidos aproximadamente en un 5% del peso vivo del animal (Brem *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los minerales necesarios para complementar las dietas de los animales son: Cobalto (Co), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Selenio (Se), Yodo (I) y Zinc (Zn).

Uno de los microminerales involucrado con la capacidad reproductiva de los animales es el Zn. Normalmente, está presente en el alimento, pero su biodisponibilidad dependerá de la fuente, concentración de fitatos, edad, sexo, estado de salud y actividad de los animales (Acda y Chae, 2002).

Desde el punto de vista fisiológico este mineral interviene durante el desarrollo de los mamíferos, y cuenta con amplias funciones tales como: almacenamiento y liberación de insulina; confiere integridad a la membrana celular; actúa en procesos de maduración sexual y en la reproducción; participa en actividades de sensibilidad olfativa y gustativa; es un activo componente de la función tiroidea y de los procesos de coagulación sanguínea, actúa como co-factor de al menos 300 enzimas incluyendo la anhidrasa carbónica y es activo previsor del estrés oxidativo (Zn superóxido dismutasa; ZnSOD), así como en la conformación de las metalotioneínas (MT) (Maret, 2001; Andreini *et al.*, 2006) quienes capturan superóxidos y radicales hidroxilo (Ménézo *et al.*, 2011; Haase *et al.*, 2008). Además, es importante en la respuesta inmunológica, crecimiento, desarrollo (proliferación celular), síntesis hepática de la hormona del crecimiento (GH), secreción de IGF-1 mejorando la producción de células osteoblásticas. También, es importante en la fertilidad, función y desarrollo anatómico normal de los órganos reproductivos, activación de enzimas que participan en la esteroidogénesis, así como en la espermatogénesis y foliculogénesis (Huang *et al.*, 1999; Arthington *et al.*, 2002; Favier y Hininger-Favier., 2005; Cheah *et al.*, 2011).

En el caso de la espermatogénesis, el efecto nutricional solo puede ser evaluado de forma precisa si se establecen protocolos a lo largo de un ciclo espermático, el cual en el verraco dura entre 6 a 7 semanas (Kemp *et al.*, 1989; Dritz *et al.*, 2001; Estienne *et al.*, 2005).

No es menor el hecho que cada semental responde a los efectos ambientales de forma distinta, por ello se encuentran en la línea de producción machos que muestran más libido, siendo esto un punto a favor para montar más rápido en el maniquí de extracción seminal y por tanto su permanencia en el centro de transferencia genética (CTG) se asegura de inicio (Ljungvall *et al.*, 2006; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Šprysl *et al.*, 2010; Rothschild y Ruvinsky, 2011), pero estas diferencias también pueden estar relacionados con la condición nutricional y de salud de los animales. Por ello, es indispensable identificar si el estado nutricional es consecuencia de los macronutrientes o de los micronutrientes, entre los cuales está el Zn.

Es frecuente encontrar que en los CTGs se tome decisiones terapéuticas para solucionar signologías clínicas en los verracos, o problemas de producción seminal. Los tratamientos terapéuticos para el caso de los aspectos reproductivos incluyen el uso de micronutrientes, como son el Selenio (Se), Zn, y vitamina E, e incluso vitaminas hidrosolubles a dosis frecuentemente superiores a las recomendadas (mg) o legalmente permitidas (>300mg/día/verraco).

Aunque no se descarta el uso de mayores concentraciones de Se, Zn y Vit. E en el alimento. En particular el Zn en la última década, se ha incrementado su inclusión a las dietas (dosis mayores a 150 ppm), asumiendo que su estímulo en el aparato reproductivo favorecerá positivamente la espermatogénesis y la producción hormonal, estimando con ello un incremento en el número de dosis seminales producidas, además de evitar una disminución en la libido, (Hahn y Baker, 1993; Croxford *et al.*, 2011; García-Contreras *et al.*, 2011). Lo anterior no es del todo cierto, ya que el exceso de Zn puede producir un bloqueo en los sistemas de transferencia del propio mineral y de otros divalentes. Así como la disminución en el estímulo de expresión de los genes que intervienen en la unión de la MT (metalotioneína) con el Zn (Rojas *et al.*, 1995).

Asimismo, cuando los cerdos son alimentados con niveles excesivos de Zn, ya sea por los mg ingresados a la dieta o por la falta de ajuste debida a la biodisponibilidad (ZnO 60%; ZnSO<sub>4</sub>, 80%) de la fuente, este mineral puede contribuir a la contaminación ambiental, ya que se excreta a través de las heces u orinas de esos animales alimentados con dietas excedidas (Cuadro 1). Otros factores relacionados con las fuentes y disponibilidad del Zn son la solubilidad en la digesta, pH, concentración del mineral en la dieta, interacción con otros minerales, composición de la dieta (fitatos), raza, edad y sexo (Schlegel *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Fuentes orgánicas e inorgánicas de Zn y sus porcentajes de biodisponibilidad.

| Fuente                   | Compuesto                            | % de Zn                             | % Biodisponibilidad |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Sulfato de Zn            | ZnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O  | 35.5 <sup>1</sup> , 35 <sup>2</sup> | 100                 |
| Sulfato de Zn            | ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O | 22.3 <sup>1</sup> , 22 <sup>2</sup> | 100                 |
| Cloruro de Zn            | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 <sup>1</sup>                     | 100                 |
| Carbonato de Zn          | ZnCO <sub>3</sub>                    | 56 <sup>1</sup> , 52 <sup>2</sup>   | 100                 |
| Zn elemental             | Zn                                   | 100                                 | 130                 |
| Óxido de Zn              | ZnO                                  | 72 <sup>1</sup> , 73 <sup>2</sup>   | 50-80               |
| Lisinato de Zn (Zn-Lis)  | Zn, aminoácido                       | Variable                            | 95-100              |
| Metionato de Zn (Zn-Met) | Zn, aminoácido                       | Variable                            | 95-100              |
| Complejo Polisacárido-Zn | Zn, Polisacárido                     | Variable                            | 95-100              |
| Complejo Polisacárido-Zn | Zn, Polisacárido                     | Variable                            | -----               |

Fuente: García (2010)<sup>1</sup>; Meisinger (2010)<sup>1</sup>; Santiago (2011)<sup>2</sup>; NRC (1998).

Si bien el Zn es fundamental en todas las etapas de la vida, en especial en los machos en crianza es fundamental para desarrollar adecuadamente las células de Leydig, ya que una disfunción de estas, no permite la producción adecuada de andrógenos (Testosterona), lo cual reduce a su vez el crecimiento testicular, el desarrollo de túbulos seminíferos, la espermatogénesis, esteroidogénesis y el establecimiento de los receptores de hormonas (andrógenos), obteniendo con ello un retraso en la pubertad (Hesketh, 1982; Close y Roberts, 1991; Close y Roberts, 1993; Mateos *et al.*, 1996; Strezezek *et al.*, 2000; Quiles y Hevia, 2002; Marchensi, 2004; Salgueiro *et al.*, 2004).

De los primeros trabajos realizados con Zn se cuenta con el elaborado por Liptrap *et al.* en 1970, quienes otorgaron dietas con 22 a 29 ppm de Zn, induciendo la aparición de lesiones de paraqueratosis en los machos, una baja tasa de crecimiento y disminución del consumo voluntario; estos signos no se presentaron en machos con dietas que contenían 48 y 53 ppm. En 1982, Hesketh compara dietas bajas en el contenido de Zn (22 a 25 ppm de Zn), y altas (170 a 175 ppm). Estas dietas las suministró a cerdos desde los 20 Kg, obteniendo que el Zn no afecta el peso del testículo, pero al medir la presencia del mineral en el parénquima, el nivel de Zn fue menor en las dietas que contenían niveles bajos del mineral y el desarrollo de las células de Leydig se vio afectado negativamente. También Liao *et al.* (1985) alimentaron a verracos Duroc con dietas que contenían Zn a niveles de 32, 89, 146 y 197 ppm, durante un periodo de 13 meses, colectando semen cada 4 a 5 días. Los niveles de Zn no afectaron la proporción de espermatozoides con anormalidades, pero el número de espermatozoides fue mayor en verracos con alimento que contenía 89 o 146 ppm de Zn. Por su parte De Loera *et al.* (2011), observaron que el utilizar ZnSO<sub>4</sub> o ZnO a una concentración de 150 ppm, no produjo diferencias en la concentración espermática, a pesar de la distinta biodisponibilidad de las fuentes. Pero al evaluar las células de Leydig, en tejido testicular de verracos tratados con estas fuentes, si se observaron mejorías significativas en el número de células de Leydig (CL) en los tratamientos que recibieron Zn, ya que el tratamiento que no incluyo Zn y solo contenía 25ppm de Zn a través de los ingredientes de la dieta mostraba un menor número de CL. Sin embargo, el aumento de CL no se ve reflejado en el Índice Gonadosomático y por lo tanto el peso testicular no se aumentó. Es

probable que los niveles de Zn en cerdos en crecimiento no deban superar 150 ppm, ya que con 25 ppm, se obtiene un Índice Gonadosomático similar. En otras investigaciones (Close, 1990; ARC, 1990; Marchensi, 2003) se observó que niveles de 100ppm son recomendados para estimular el desarrollo de los testículos, y señalan que con 45 a 50 ppm se reduce el desarrollo de las gónadas. Lo anterior no concuerda con De Loera *et al.* (2011), quienes observaron que niveles de 25 ppm de Zn en dietas para cerdos en crecimiento pueden no afectar el desarrollo testicular, debido a que los índices gonadosomaticos y el desarrollo del epitelio testicular no se afecta y pueden perfectamente producir espermatozoides íntegros y de calidad adecuada, aunque la producción seminal si llega a verse afectado, según sea el macho a tratar y la época del año.

Es importante señalar que la época del año suele afectar la calidad seminal, por lo que esto puede estar relacionado con el estrés térmico al que están sometidos los sementales y por ello existe un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Aunque una temperatura sostenida por más de 24 horas, por arriba de los 25°C pueden ayudar a que se produzca un proceso de reducción de células espermáticas y volumen de eyaculado.

Cuando existe estrés térmico, los requerimientos de Zn suelen aumentar, por lo cual se requiere aumentar el suministro, para evitar que los cerdos presenten una disminución en la libido y baja concentración espermática (Saez-Cidoncha *et al.*, 1997; Quiles y Hevia, 2002).

En el caso de la enzima 5  $\alpha$ -reductasa, se ha observado que el Zn a bajas concentraciones en machos en crecimiento reducen la concentración de la misma, evitando que exista una conversión de testosterona a su metabolito dihidrotestosterona (DHT). La 5  $\alpha$ -reductasa es la responsable de los caracteres sexuales secundarios y de la aparición de los signos de pubertad (Mahan *et al.*, 2002), incluidos en este último la libido, por lo que dietas con bajo nivel de Zn pueden afectar la aparición de la pubertad, o el comportamiento líbido del macho (At-taras *et al.*, 2006; Viera *et al.*, 2008; García y De Loera, 2007).

Para el caso de las hembras, el Zn de las dietas y su relación con el desarrollo de los folículos debe ser similar al que se establece en los machos, sin embargo hoy en día poco se puede decir, ya que en hembras prepúberes no hay evidencia suficiente sobre la importancia del Zn en el desarrollo reproductivo. La nutrición puede influir entre otras cosas la sobrevida embrionaria y el desarrollo folicular y como consecuencia la calidad del ovocito (Almeida *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2002). En consecuencia, es posible que el desarrollo embrionario preimplantacional en animales domésticos requieran de la incorporación de varios micronutrientes para una buena función reproductiva. Es en este sentido que los estudios realizados por Bedwal *et al.* (1994) demostraron que una deficiencia de Zn puede llegar a provocar el desarrollo

anormal de los ovarios, la interrupción del ciclo estral, y la reducción de la calidad de los ovocitos, entre otros problemas.

Asimismo, en 1983 Hill *et al.* demostraron en las primerizas, que durante el último tercio gestacional, un estado carencial incrementa el periodo de gestación y afectan la viabilidad de los lechones.

En el caso de las hembras prepúberes, estas suelen ser alimentadas con dietas para cerdos en etapa de crecimiento, lo que permite asumir un consumo de proteína suficiente para que desarrollen su musculatura, y su aparato óseo, sin incrementar el nivel de grasa corporal por arriba de los 22 mm en la posición P2 (García *et al.*, 2012). Sin embargo, la formula mineral utilizada para estas hembras frecuentemente es la misma que para los cerdos que van a ser llevados a sacrificio, lo cual no favorece el desarrollo del aparato reproductivo.

Kaswan *et al.* (1995) demostraron que un nivel bajo de Zn puede producir atresia folicular, una baja ovulación y degeneración de las células de la granulosa, así como la reducción de la producción de estrógenos. De la misma manera en cabras con una inclusión deficiente de Zn con 15ppm se observó que presentaron folículos atrésicos, mientras que las cabras alimentadas con una inclusión de 65 ppm no mostraron ninguna anomalía, lo cual indica que este mineral es necesario para el funcionamiento normal del epitelio germinal del ovario (Aruna, 1985).

El Zn se encuentra presente en los cigotos y embriones formando parte de las metaloproteínas involucradas en el desarrollo embrionario y la organogénesis (Kambe *et al.*, 2008).

Por otro lado, el contenido total de Zn del ovocito durante su maduración se encuentra sometido a grandes cambios en su concentración, aumentando en más del 50% durante la reanudación meiótica y disminuyendo en la etapa embrionaria de dos células. Estos cambios profundos en el contenido intracelular de Zn son necesarios para la correcta maduración citoplasmática y la normal progresión de la meiosis (Kim *et al.*, 2011). Estos resultados ponen de manifiesto la imprescindible participación del Zn en la obtención de un ovocito de mamífero maduro y competente capaz de sostener el desarrollo embrionario temprano (Anchordoquy, 2012).

Parra-Forero *et al.* (2014) mostró que cada estadio de maduración de los folículos tiene una diferente concentración de Zn, lo que está correlacionado además con la calidad del ovocito (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración de Zn en folículos de cerdas, en diferente estadio.

| Grupo                   | Concentración de Zn (pg/ml) |       | Volumen (ml) |       | Concentración total de Zn/folículo |      | P=F   |
|-------------------------|-----------------------------|-------|--------------|-------|------------------------------------|------|-------|
|                         | Media                       | EEM   | Media        | EEM   | Media                              | EEM  |       |
| Folículo 1 <sup>a</sup> | 28.58                       | 10.25 | 146.0        | 43.27 | 3.62                               | 0.78 | 0.001 |
| Folículo 2 <sup>b</sup> | 46.82                       | 17.82 | 189.0        | 50.93 | 5.54                               | 1.35 | 0.001 |
| Folículo 3 <sup>c</sup> | 32.87                       | 11.71 | 112.6        | 28.84 | 8.29                               | 2.10 | 0.001 |

Fuente: Parra-Forero *et al.*, 2014

De manera general, tanto para hembras como para machos, es fundamental que en las dietas exista un equilibrio entre los minerales que se suministran, concentración y relación con las necesidades de nutrientes de los animales, son factores que afectan su utilización (Creech *et al.*, 2004). En particular el Zn, no hay que olvidar que es un divalente y por tanto se deberá tener en consideración la cantidad de Cu, Ca, Fe y su relación con el Zn, para evitar bloqueos de transporte y almacenaje (García-Contreras, 2010).

## Bibliografía

**Almeida** F.L., Leal M.C., França L.R. 2006. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biology of Reproduction*.75:792–799.

**Andreini** C., Banci L., Bertini I., Rosato A. 2006. Zinc through the three domains of life. *Journal of Proteome Research*. 5 (11):3173-3178.

**AOAC**. 2000. *Official Methods of Analysis (17th Ed.)*. Association Official Analytical Chemists, Arlington, VA. USA.

**Close** W.H. Cole D.J.A. 2000. *Nutrition of Sows and Boars*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

**Cousins** R.J., Iuizzi J.P., Lichten L.A. 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (34):24085–24089.

**Cromwell** G.L., Hays V.W., Scherer C.W., Overfield J. 1972. Effects of dietary calcium and phosphorus on performance and carcass, metacarpal and turbinata characteristics of swine. *J. Anim. Sci.* 34:746.

**Eaton** D.L., Toal B.F. 1982. Evaluation of the Cd-hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 66:134.

**Eaton** D.L., Cherian M.G. 1991. Determination of metallothionein in tissues by cadmium-hemoglobin affinity assay. *Methods in Enzymology*, New York, v.205.p.83-88.

**Estienne** M.J., Harper A.F. 2000. PGF2 $\alpha$  Facilitates the training of sexually active boars for semen collection. *Theriogenology*. 54:1087-1092.

**Estienne** M.J., Harper A.F., Knight J.W., Barb C.R., Rampacek G.B. 2004. Sexual behavior after treatment with prostaglandin-F2 $\alpha$  in boars with suppressed concentrations of gonadal steroids. *Applied Animal Behaviour Science* 89: 53-57.

**Enciso** L.M. 2009. La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

**Favier** M., Hininger-Favier I. 2005. Zinc et grossesse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 33: 253–258.

**FEDNA**. 2006. Necesidades nutricionales para ganado porcino: Normas FEDNA. Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España.

**Franklin** R.B., Costello L.C. 2009. The important role of the apoptotic effects of Zinc in the development of cancers. *J. Cell. Biochem*. April 1; 106(5): 750–757.

**Gadea** M.J. 1997. Predicción de la fertilidad “in vivo” de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración “in vitro”. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España. Pp 30-55.

**García** C. A. 2010. Efecto de la fuente y nivel de Zn en la morfometría testicular y epididimaria, así como su relación con la producción y calidad seminal de verraco. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. Pp. 1-284.

**García** C.A., De Loera O.Y., García A.C., Palomo A., Guevara J., Herrera-Haro J., López-Fernández C., Johnston S. Gosálvez J. 2011. Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reproductive Toxicology*. En prensa.

**González-Márquez** H.I, Ortiz R., Herrera J.A., García A., Betancourt M., Fierro R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 59:1171-1180.

**Henriques** G.S., Cozzolino S.M.F. 2001. Determination of metallothionein levels in tissues of young rats fed zinc-enriched diets. *Rev. Nutr.* 14(3): 163-169.

**Hernández** A. 2006. Influence of the form and level of organic versus inorganic copper and zinc in diets for growing and finishing pigs. Thesis Master of Philosophy . Division of Health Sciences School of Veterinary and Biomedical Sciences. Murdoch University, Australia. Pag. 153.

**Herrera** H. J.G., García A.C. 2010. Bioestadística en ciencias veterinarias: procedimientos de análisis de datos con SAS. UCM. Editorial Complutense. Área Ciencias de la Salud. Madrid. España. I.S.B.N.: 978-84-96704-31-2.



Hoy St., Rohrmann St. 2007. Investigations on behavior of boars in semen processing centres. XII Symposium Internacional: Dr. Santiago Martin Rillo. Reproducción e I.A. en porcinos. Toledo, España.

**Iguchi** K., Otsuka T., Usui S., Ishii K., Onishi T. Sugimura Y., Hirano K. 2004. Zinc and Metallothionein levels and expression of zinc transporters in androgen-independent subline of LNCaP cells. *Journal of Andrology*.25(1):154-161.

**Ikeda** H., Kikuchi K., Noguchi J., Takeda H., Shimada A., Mizokami T., Kaneko H. 2002. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. *Theriogenology*. 57:1309-1318.

**Keulen** J.V., Young B.A. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.*, 44:282-287.

**Kikuchi** K., Nagai T., Kashiwazake N., Ikeda H., Noguchi J., Shimada A., Soloy E., Kaneko H. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology*. 50:615–623.

**Kim** B.G., Lindemann M.D. 2007. Review: An Overview of Mineral and Vitamin Requirements of Swine in the National Research Council (1944 to 1998) Publications. *The Professional Animal Scientist* 23:584–596.

**López-Fernández** C., Fernández J.L., García P., Gonsálbez A., Gosálvez J. 2006. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescent microscopy. *Theriogenology*. 65:308-316.

**Lunstra** D.D., Wise T.H., Ford J.J. 2003. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biology of Reproduction* 68:140–150.

**MacDonald** R.S. 2000. The role of Zinc in growth and cell proliferation. *Journal of Nutrition*. 130:1500S-1508S.

**Maret**. W. 2001. Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis – recent insights and current trends. *BioMetals* 14: 187–190.

**Maret**. W., Li Y. 2009. Coordination dynamics of Zinc in proteins. *Chemical Reviews*. 109, 4682–4707

**Martínez** M.M., Hill G., Link J.L., Raney N.E., Tempelman R.J., Ernst C.W. 2004. Pharmacological Zinc and Phytase Supplementation Enhance Metallothionein mRNA Abundance and Protein Concentration in Newly Weaned Pigs. *J. Nutr.* 134: 538–544.

**Marchesi** M.G. 2005. Nutrición del verraco. *Producción Animal*. 20(207):4-14.España.

**Mateos** G.G., García J.M., Gracia L.M. 1998. Composición micromineral y vitamínica de correctores comerciales: premezclas para porcino. XIV Curso de Especialización. Avances en nutrición y alimentación animal. FEDNA. Barcelona, España. Pp. 313-340.

**Mendoza** Huaitalla R., Gallmanna E., Zhenga Kun., Liua X., Hartunga E. 2010. Heavy metals contents in farrowing, weaning and fattening pig feeds in a commercial pig farm in Beijing and their thresholds values given by the Chinese feed standards. *Advances in Animal Biosciences* 1: 470-471.

**Messaoudi** I., Banni M., Saïd L., Saïd K., Kerkeni A. 2010. Evaluation of involvement of testicular metallothionein gene expression in the protective effect of zinc against cadmium-induced testicular pathophysiology in rat. *Reproductive Toxicology* . 29:339–345.

**Molto** P.E. 2005. Clonaje, expresión y caracterización estructural de una nueva Metalotioneína de crustáceos a partir de la langosta *Panulirus argus*. Estudios de su función en la mitocondria. Tesis doctoral en Ciencias Químicas. Universidad Castilla-La Mancha. España. Pp. 38-46.

**Molokwu** C.O., Li Y.V. 2006. Zinc Homeostasis and bone mineral density. *Ohio Research and Clinical Review*. 15:7-15.

**Mutembei** H.M., Pesch S., Schuler G., Hoffmann B. 2005. Expression of oestrogen receptors a and b and of aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reprod Dom Anim* 40, 228–236.

**NRC**. 1998. Nutrient Requirements of Swine, 10th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

**NSNG**. 2010. National Swine Nutrition Guide. Tables on nutrient recommendations, ingredient composition, and use rates. Pork center of excellence. Iowa State University. USA.

**Oonk** H.B., Turkstra J.A., Lankhof H., Schaaper W.M.M., Verheijdenb J.H.M., Meloena R.H. 1995. Testis size after immunocastration as parameter for the absence of boar taint. *Livestock Production Science*. 42:63-71.

**Osuji** P.A., I. Nsahlai and H. Kahlili. 1993. Feed evaluation. ILCA Manual. Internacional Livestock Center for Africa. 40 p.

**Pagano** A.R., Yasuda K., Roneker K.R., Crenshaw T.D., Gen Le X. 2007. Supplemental *Escherichia coli* phytase and strontium enhance bone strength of young pigs fed a phosphorus-adequate diet. *J. Nutr.* 137:1795–1801.

**Palmiter** R.D., Findley S.D. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *The EMBO Journal*. 14(4):639-649.

**Parra-Forero** L.Y., Vela-Correo G., Cano-Flores O., Mendoza G., Romo S., García-Contreras A.C. 2014. Concentration of Zn in liquid follicular pigs female. Introduction to the oovogenesis metabolomics. IPVS. P670. México.

**Robinson** J.J. 1990. Nutrition in the reproduction of farm animals. *Nutrition Research Reviews*. 3, 253-216.

**Rojas** L.X., McDowell L.R., Cousins R.J., Martin F.G., Wilkinson N.S., Johnson A.B. Velasquez J.B. 1995. Relative bioavailability of two organic and two inorganic zinc sources fed to sheep. *J Anim. Sci.* 73:1202-1207.

**Salas R.M.** 2008. Efecto de fitasa *Aspergillus niger* en la digestibilidad de nutrientes y actividad de tripsina y quimotripsina en cerdos destetados. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp. 44-45.

**Schlegel P.**, Nys Y., Jondreville C. 2010. Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source. *Animal*. 4:2, pp 200–209.

**Schneider F.**, Falkenberg H., Kuhn G., Nürnberg K., Rehfeldt Ch., Kanitz W. 1998. Effects of treating young boars with a GnRH depot formulation on endocrine functions, testis size, boar taint, carcass composition and muscular structure. *Animal Reproduction Science*. 50:69–80.

**Slavin W.** 1968. Atomic Absorption Spectroscopy. John Wiley and Sons, N. Y., N.Y. Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. 1996. Bioestadística: Principios y Procedimientos Segunda Edición. McGraw- Hill. 622 p.

**Szabó J.**, Hegedus M., Bruckner G., Kósa E., Andrasofszky E., Berta E. 2004. Large doses of zinc oxide increases the activity of hydrolases in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15:206-209.

**Turgut S.**, Kaptanoğlu B., Turgut G., Emmungil G., Genç O. 2005. Effects of cadmium and zinc on plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor-binding protein 3. *Biol. Trace. Elem. Res.* 108:197–204.

**Zamaratskaia G.**, Rydhmer L., Andersson K.H., Chen G., Lowagie S., Andersson K., Lundström K. 2008. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac TM, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Animal Reproduction Science* 108:37–48.