

Efecto de la metionina de zinc en el casco del equino: una evaluación por microscopía electrónica de barrido ambiental

Effect of zinc methionine on the equine hoof: an evaluation by environmental scanning electron microscopy

Rosario Neri Basurto* Lilia Solís Arrieta* Hilda Villegas Castrejón*
José Antonio Esquivel Martínez** Carlos Alberto Castro Herrera**

Abstract

The hoof is a relatively simple structure, mainly constituted by keratin, a highly sulfated protein, that provides hardness to the hoof and certain elasticity to support the weight and distribute the impact's intensity on the hoof. The hoof needs to have an adequate quality to be able to carry out these functions and that requires a good nutrition based on proteins, vitamins and minerals. Minerals constitute 4% of body weight and they are conformed by macrominerals (calcium, phosphorus, sodium, chloride, potassium, magnesium and sulfur) and microminerals (selenium, iodine, copper and zinc). Zinc participates in hoof formation while inducing keratin production. Its diet deficiency causes problems to the corneous tissue such as: thin and friable hooves, and fissures on the wall. Zn^{++} must be ingested in chelated form, as zinc methionine, to be adequately absorbed. The diet of seven horses was supplemented with 5.4 g/day/horse of zinc methionine for a period of six months. Samples were obtained from the wall level and transverse cuts were done; before and after the treatment, its morphology and contents of minerals (Mg^{++} , Cl, S, Ca^{++} , Na^{++} , K^{+} , P, Si, Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++}) were analyzed in the environmental scanning electron microscope equipped with an X ray disperser. It was observed that the morphology presented a better constitution and compactness of the tubular and intratubular horns in the medium stratum, as well as a substantial increment of zinc (32.9%) and sulfur (68.4%), which suggests an increase in keratin and better structure of the hoof.

Key words: HOOF, CHEMICAL ANALYSIS, HORSE, ZINC METHIONINE.

Resumen

El casco es una estructura relativamente sencilla, constituida por queratina, proteína bastante sulfatada, que provee al casco de dureza y cierta elasticidad para soportar el peso y distribuir la intensidad del impacto en el casco. Para este fin, se necesita que el casco tenga una calidad adecuada, que requiere de buena nutrición basada en proteínas, vitaminas y minerales. Los minerales constituyen 4% del peso corporal y se conforman en macrominerales (calcio, fósforo, sodio, cloro, potasio, magnesio y azufre) y microminerales (selenio, yodo, cobre y zinc). El zinc participa en la formación del casco al inducir la producción de queratina. Su deficiencia en la dieta causa problemas al tejido córneo, como cascos delgados, friables y fisuras en la pared. Para que el Zn^{++} sea absorbido adecuadamente, es necesario que sea ingerido en forma quelada como metionina de zinc. La dieta de siete caballos fue complementada con 5.4 g/día/caballo de metionina de zinc por un periodo de seis meses. Se obtuvieron muestras a nivel de la muralla y se realizaron cortes transversales; antes y después del tratamiento, se analizó su morfología y contenido de minerales (Mg^{++} , Cl, S, Ca^{++} , Na^{++} , K^{+} , P, Si, Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++}) en el microscopio electrónico de barrido ambiental equipado con dispersor de rayos X. Se observó que la morfología presentaba mejor constitución y compactación de los cuernos tubulares e intratubulares en el estrato medio, así como aumento sustancial de zinc (32.9%) y de azufre (68.4%), lo cual sugiere incremento de queratina y mejor estructuración del casco.

Palabras clave: CASCO, ANÁLISIS QUÍMICO, CABALLO, METIONINA DE ZINC.

Recibido el 25 de enero de 2007 y aceptado el 14 de febrero de 2008.

*Servicio de Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calzada México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Tlalpan, 14389, México, D. F., Tel. 5999-1000, ext. 19107, Fax: 5603-9197.

**Laboratorios Kevo Products, Prolongación Centenario, Privada 10-2, Col. Santa Rosa Xochiaca, 01830, México, D. F., Telefax: 5810-6290, correo electrónico: mneri@inr.gob.mx

Correspondencia: Rosario Neri Basurto, Servicio de Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calzada México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Tlalpan, 14389, México, D. F., Tel. 5999-1000, ext. 19107, Fax: 5603-9197.

Introduction

The equine hoof is a protective structure due to keratin hardness. It is also biomechanic to disperse strengths applied to it by floor impact. It is formed by keratin that is harder than skin because it contains larger sulfur quantities. This protein causes the hoof to be hard but with certain expansion elasticity to support the equine weight and to spread the strength from hoof impacts. Therefore, it must have a good quality provided by hormones, vitamins and minerals.^{1,2} Minerals represent 4% of body weight and are divided in to macrominerals, required in certain percentages such as calcium (Ca^{++}), phosphorus (P), sodium (Na^{++}), chloride (Cl^-), potassium (K^+), magnesium (Mg^{++}) and sulfur (S), and microminerals or trace minerals, that are required by parts per million (ppm or mg/kg): selenium (Se), iodine (I), cooper (Cu^{++}), zinc (Zn^{++}). Because Zn^{++} is a component of more then 200 enzymatic systems, it is a key mineral for the keratinization process; three basic functions have been demonstrated: catalytic, structural and regulator for keratinocyte proliferation and differentiation.^{3,4}

Since mineral deficiency exists in intensive horse breeding, the importance of these elements for equine nutrition has been studied from 1960. One of the trace elements that has gained importance during the last years is zinc, because enough quantities of this mineral are not consumed causing alterations of the corneous tissue, such as thin, friable hoofs with wall fissures and corneous tissue that crumbles around horseshoe nails, etc.^{2,5} There are several products in the market to improve hoof quality based on zinc alone or in compounds as quelates (zinc sulfate, zinc oxide and zinc methionine).⁶ However, better results are obtained if zinc methionine is included in the diet, because it is directly absorbed by the small bowel towards blood stream to reach corneous structures.⁷⁻¹¹

Zinc methionine is involved in keratin production and structuring of the wall stratus of the hoof. It also acts in the epidermal germinal stratus to produce tubules that are jointed by non structured horns, produced by interpapillary epidermis to create hoof wall and sole.^{2,12}

Bad quality of the equine hoof is caused by zinc deficiency of the diet. When zinc methionine is supplemented, a good hoof growth quality is expected, as well as reestablishment of keratin deficiency, avoiding fragile and soft hoofs.

Material and methods

Seven male, adult hoses of the Percheron breed with different weight and husbandry function were used.

Introducción

El casco de caballo es protector por la dureza de la queratina; también es biomecánico para dispersar las fuerzas que se ejercen sobre él al impacto con el suelo. Está conformado por queratina, que es más dura que en la piel debido a que contiene mayor cantidad de azufre. Esta proteína permite que el casco tenga dureza y cierta elasticidad de expansión para soportar el peso del equino y repartir la fuerza de golpes en el casco; por tanto, debe tener buena calidad, proporcionada por hormonas, vitaminas y minerales.^{1,2} Los minerales constituyen 4% del peso corporal y se dividen en macrominerales, requeridos en cierto porcentaje, como calcio (Ca^{++}), fósforo (P), sodio (Na^{++}), cloro (Cl^-), potasio (K^+), magnesio (Mg^{++}) y azufre (S). Los microminerales o minerales traza son los que en la dieta se requieren en partes por millón (ppm o mg/kg): selenio (Se), yodo (I), cobre (Cu^{++}), zinc (Zn^{++}). El Zn^{++} es un mineral clave en el proceso de queratinización, ya que es un componente de más de 200 sistemas enzimáticos y se le han demostrado tres funciones básicas: catalítico, estructural y regulador, para la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.^{3,4}

En la crianza de caballos en forma intensiva existe deficiencia de minerales, por lo que a partir de 1960 se estudia la importancia de éstos en la nutrición del caballo. Uno de los elementos traza que ha tomado relevancia en los últimos años es el zinc, debido a que no se consume la cantidad necesaria de este mineral, ello ocasiona alteraciones del tejido córneo, como cascos delgados, friables, fisuras en la pared y tejido córneo que se desmorona alrededor de los clavos de las herraduras, etc.^{2,5} En el mercado se encuentran varios productos de zinc que mejoran la calidad del casco, solo o en compuestos como los quelatos (sulfato de zinc, óxido de zinc y metionina de zinc).⁶ Sin embargo, se obtienen mejores resultados si se incluye en la dieta la metionina de zinc, pues se absorbe directamente del intestino delgado al torrente sanguíneo para llegar a las estructuras córneas.⁷⁻¹¹

La metionina de zinc está involucrada en la producción de la queratina y su estructuración en los estratos de la pared del casco. También actúa en el estrato germinativo de la epidermis para producir los túbulos que se unen por medio de cuernos no estructurados, producidos por la epidermis interpapilar para formar la muralla y suela del casco.^{2,12}

La mala calidad del casco del equino se debe a deficiencia de zinc en la dieta; al complementarla con metionina de zinc se espera obtener buena calidad en su crecimiento y restablecer, a su vez, la deficiencia de queratina, evitando cascos quebradizos y blandos.

The horses showed the following problems in the hoof corneous tissue: cracked hind quarters, fragile hoofs and detached horseshoes. Horse diet was supplemented with zinc methionine (5.4 g/day/horse)* for six months. Horses were treated according to the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-98, for laboratory animal care and use.

Two centimeter thick fragments were obtained from the superior part of the hoof walls, before and after treatment. Transverse cuts of the samples were done to expose the medium stratus. No preparation treatment was applied (fixation, post-fixation) to the samples, nor conductive material was used to cover them (gold, carbon). Samples were observed and analyzed directly by environmental scanning electron microscopy ESEM XL-30**.

Samples were observed in high vacuum with back-scattered electrons (BSE) from 15 to 20 Kv and a 4.0 to 5.0 spot.

Analyses for macromineral (Mg^{++} , Cl^- , S, Ca^{++} , Na^{++} , K^+ , P) and trace mineral (Si, Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++}) contents were done by energy dispersive X-ray analysis (EDX)*** with ten punctual analyses a crossed pattern throughout all the medium stratus surface. Quantification was done in environmental mode because the horse hoof is a non-conductive biological sample. Working conditions were: 30 Kv, 200 live seconds, 10 mm, working distance, 2 000 counts per second and 4.0 Torr pressure.

The T test for dependant groups was done with $P < 0.05$ for the statistical analysis, using the SPSS statistical package for Windows version 10.0.

Results

Hoofs were slimmer, with cracked wall and corneous tissue at macroscopical level before the zinc methionine treatment, as well as frequent horseshoe losses. At microscopical level, the medium stratus was a disorganized structure, the keratin scales were poorly defined in the intertubular and tubular horns, with some fissures (Figures 1 A y B).

Six months after the zinc methionine treatment better quality of the hoof was found in all cases, with increase in the corneous tissue growth. The hoofs acquired good shape and appearance. When the medium stratus was examined by electron microscopy, a compacted and cohesive structure was observed, in which the intratubular horns did not have cracks or fissures any more. The tubular and intratubular horns were well defined and organize throughout all the medium stratus (Figures 2 A y B).

It was determined that the medium stratus is constituted by macroelements, such as Mg^{++} , Cl^- , S, Ca^{++} , Na^{++} , K^+ , P, as well as by microelements as Si, Fe^{++} ,

Material y métodos

Se utilizaron siete caballos, machos, adultos, de la raza Percherón, de diferente peso y función zootécnica, que presentaban los siguientes problemas en el tejido córneo del casco: quebraduras de cuartos, cascos quebradizos y desprendimiento de herraduras. La dieta de los caballos fue complementada con metionina de zinc (5.4 g/día/caballo)* durante seis meses. Los caballos fueron tratados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-98, para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se obtuvieron fragmentos de 2 cm de espesor de la parte alta de la muralla de los cascos, antes y después del tratamiento. Se realizaron cortes transversales de las muestras para exponer el estrato medio. No se aplicó ningún tratamiento de preparación (fijación, posfijación) de la muestra, tampoco se recubrió con material conductor (oro, carbón), la muestra se observó y analizó de manera directa con el microscopio electrónico de barrido ambiental ESEM XL-30.**

Para evaluar la morfología de la superficie del estrato medio se observó en alto vacío con electrones retrodispersados (BSE) de 15 a 20 Kv y con un spot de 4.0 a 5.0.

El análisis del contenido de macrominerales (Mg^{++} , Cl^- , S, Ca^{++} , Na^{++} , K^+ , P) y minerales traza (Si, Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++}) se realizó por dispersión de rayos X (EDX)*** con diez análisis puntuales en un patrón cruzado, mediante toda la superficie del estrato medio. La cuantificación se realizó en modo ambiental debido a que el casco de caballo es muestra biológica, no conductora. Las condiciones de trabajo de los análisis fueron: 30 Kv, 200 segundos vivos, 10 mm de distancia de trabajo, 2 000 cuentas por segundo y 4.0 Torr de presión.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de T para grupos dependientes con $P < 0.05$, utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows versión 10.0.

Resultados

A nivel macroscópico, antes del tratamiento con metionina de zinc, los cascos presentaban adelgazamiento, fisuras de la pared y del tejido córneo, así como pérdidas frecuentes de las herraduras. A nivel microscópico, el estrato medio era una estructura desorganizada, las escamas de queratina estaban mal definidas en los cuernos intertubulares y tubulares, con algunas fisuras (Figuras 1 A y B).

Seis meses después del tratamiento con metionina

*Kevo Products, México.

**Philips Electronics, Holanda.

***EDAX-New XL-30, Mahwah, Estados Unidos de América.

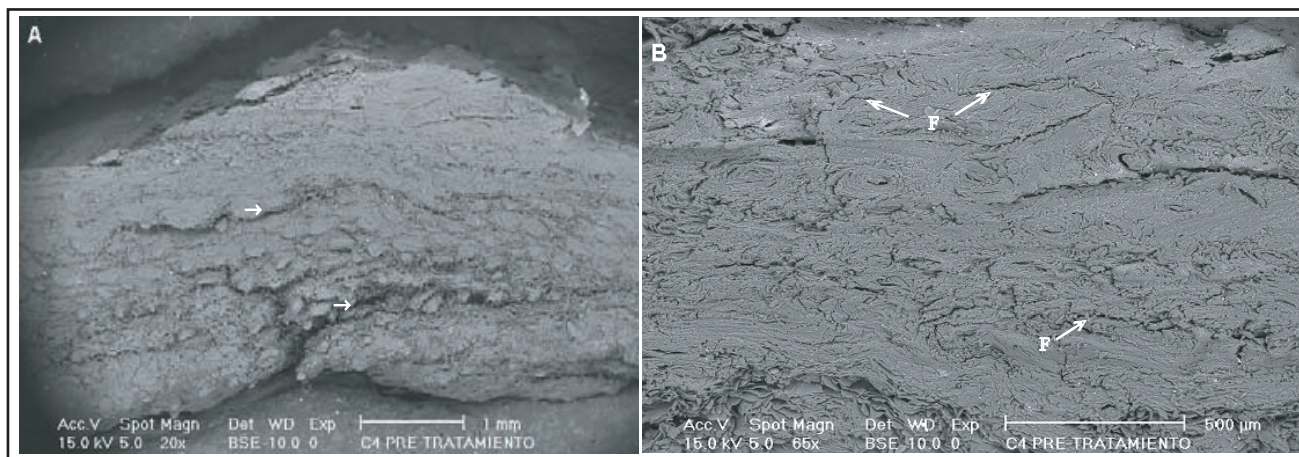


Figura 1: Corte transversal del estrato medio del casco del caballo 4 antes del tratamiento con metionina de zinc. A) Se observan algunas fracturas (→), B) Numerosas fisuras (F) Pocos cuernos tubulares e intertubulares mal definidos.*

Figure 1: Transverse cut of the medium stratus of the horse hoof 4 before zinc methionine treatment. A) Some fractures are observed (→), B) Numerous fissures (F) Few tubular and intertubular horns poorly defined*

Cu^{++} and Zn^{++} . From these minerals, Mg^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , Si, P and K^+ were not quantifiable because their concentrations were lower than 0.1%. The elements that increased with the zinc methionine treatment were S (68.4%) and Zn^{++} (32.9%) (Figures 3 and 4).

Regarding Cl^- , Ca^{++} and Na^{++} , some horses showed variable percentages, increasing or decreasing before and after treatment, respectively (Table 1).

Discussion

Biological material contains significant water amounts and has low electrical conductance. Therefore, biological samples must be fixed, dehydrated and covered with conductive material. However, the environmental electron microscope (ESEM) has an opening that limits pressure and a gaseous secondary electron detector that avoids the charge effect. This allows to work immediately with samples and without treatment, to avoid artifact production. Furthermore, it has an X-ray disperser to perform microanalysis characterized by: *a*) allowing *in situ* analysis of the sample, *b*) being quantitative and *c*) being specific for each zone of the biopsy. A consequence of the aforementioned is that its application on biology, medicine, geology and now, veterinary science has increased as an alternative technique to perform morphological and chemical analyses at the same time.

The equine hoof is formed by keratin, which function is to protect. Its formation is part of a cellular differentiation process: keratinization that transforms live epithelial cells into corneous cells that are structurally stable without metabolic activity.^{13,14} The dermis is the stratus that provides nutrients (vitamins, minerals and hormones) that modulate and control cellular differentiation in the epidermis.

de zinc se encontró mejor calidad del casco en todos los casos, con aumento del crecimiento del tejido córneo. Los cascos adquirieron buena forma y apariencia. Al examinar el estrato medio con el microscopio electrónico se observó estructura compacta y cohesiva, en la que los cuernos intratubulares ya no tenían quebraduras ni fisuras. Los cuernos tubulares e intratubulares estaban bien definidos y organizados a través de todo el estrato medio (Figuras 2 A y B).

Al realizar el microanálisis de los elementos químicos con EDX, se determinó que el estrato medio está constituido por macroelementos, como Mg^{++} , Cl^- , S, Ca^{++} , Na^{++} , K^+ , P, y microelementos como Si, Fe^{++} , Cu^{++} y Zn^{++} . De estos minerales, el Mg^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , Si, P y K^+ no fueron cuantificables por sus concentraciones menores a 0.1%. Los elementos que incrementaron con el tratamiento de metionina de zinc fueron S (68.4%) y Zn^{++} (32.9%) (Figuras 3 y 4).

En cuanto a Cl^- , Ca^{++} y Na^{++} , algunos caballos presentaron variabilidad en los porcentajes, con incremento o disminución antes y después del tratamiento, respectivamente (Cuadro 1).

Discusión

Los materiales biológicos contienen cantidades significativas de agua y tienen baja conductividad eléctrica. Por tanto, las muestras biológicas deben ser fijadas, deshidratadas y cubiertas con material conductor. Sin embargo, el microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) tiene una apertura que limita la presión y un detector de electrones secundarios gaseosos, que evita el efecto de carga, por lo cual permite trabajar las muestras de manera inmediata y sin tratamiento, para evitar la producción de artefactos. Además, presenta un dispersor de rayos X para

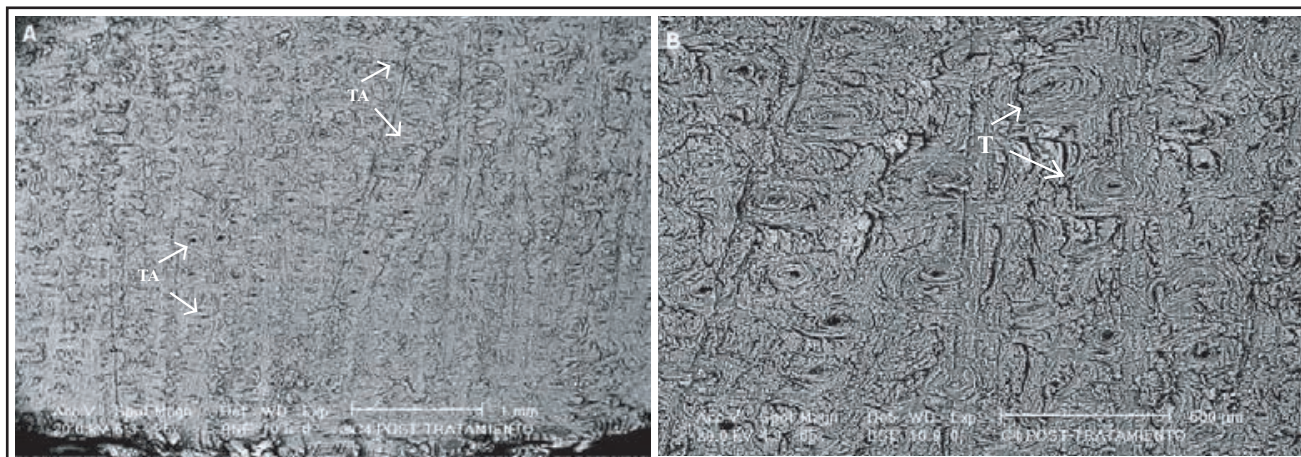


Figura 2: Corte transversal del estrato medio del casco del caballo 4 después del tratamiento con metionina de zinc. A) Se observan numerosos cuernos tubulares alineados (TA). B) Se observan los cuernos tubulares e intratubulares bien definidos y abundantes (T).

Figure 2: Transverse cut of the medium stratus of the horse hoof 4 after zinc methionine treatment. A) Several lined tubular horns are observed (TA). B) Well defined and abundant tubular and intratubular horns are observed (T).

Cuadro 1

CONCENTRACIÓN DE LOS DIFERENTES ELEMENTOS QUÍMICOS
DETERMINADOS POR EDX EN LOS CASCOS DE CABALLO
CONCENTRATION OF THE DIFFERENT CHEMICAL ELEMENTS
ASSESSED BY EDX IN THE HORSE HOOF

Number of horse	Cl^-	Ca^{++}	Na^{++}
	$x \pm SD$ (% Wt)	$x \pm SD$ (% Wt)	$x \pm SD$ (% Wt)
1. Before Zn-Met	0.159 ± 0.07	0.073 ± 0.02	0.094 ± 0.07
1. After Zn-Met	0.328 ± 0.08	0.103 ± 0.03	0.061 ± 0.03
2. Before Zn-Met	0.319 ± 0.11	0.723 ± 0.65	0.233 ± 0.12
2. After Zn-Met	0.192 ± 0.04	0.072 ± 0.03	0.060 ± 0.04
3. Before Zn-Met	0.355 ± 0.08	0.322 ± 0.20	0.195 ± 0.09
3. After Zn-Met	0.219 ± 0.11	0.162 ± 0.21	0.091 ± 0.04
4. Before Zn-Met	0.351 ± 0.05	0.090 ± 0.05	0.163 ± 0.11
4. After Zn-Met	0.551 ± 0.14	0.173 ± 0.07	0.094 ± 0.08
5. Before Zn-Met	0.499 ± 0.20	0.356 ± 0.24	0.159 ± 0.08
5. After Zn-Met	0.317 ± 0.19	0.100 ± 0.04	0.210 ± 0.16
6. Before Zn-Met	0.342 ± 0.03	0.159 ± 0.04	0.110 ± 0.06
6. After Zn-Met	0.428 ± 0.17	0.115 ± 0.03	0.113 ± 0.11
7. Before Zn-Met	0.412 ± 0.20	0.235 ± 0.05	0.204 ± 0.10
7. After Zn-Met	0.606 ± 0.16	0.381 ± 0.24	0.253 ± 0.01

It is observed in this study that zinc methionine produce clear and considerable improvement of the horse hoof, with higher morphological organization (defined and compacted tubular and intratubular horns). Even though only the medium stratus was

realizar microanálisis caracterizado por: a) permitir un análisis *in situ* de la muestra, b) ser cuantitativo y c) ser específico para cada zona de la biopsia. Como consecuencia de lo anterior, su aplicación ha incrementado en biología, medicina, geología, y ahora en

analyzed being the thicker one, a better quality of the whole hoof is evident. Therefore, this allows doing all its biomechanical and protective functions, given by hardness and insensibility, wall growth and regeneration and adaptation to the external environment.^{2,15}

From the analyzed elements by EDX (Fe^{++} , Cl^- , Ca^{++} , P , K^+ , S , Mg^{++} , Zn^{++} , Si , Na^{++} and Cu^{++}), only S and Zn^{++} increased. Though Cl^- , Ca^{++} and Na^{++} were higher than 0.1%, no tendency was observed towards decrease or increase after treatment. Fe^{++} , P , K^+ , Mg^{++} , Si and Cu^{++} were not detected because their concentrations were lower than 0.1%. Because of this, it is recommended to perform their quantification by WDX for levels lower than 0.01% Wt or by atomic force spectroscopy (AFS) that quantifies by parts per million in the sample.¹⁶ However, advantages of the EDX microanalysis, regarding AFE, include that it is done quickly, without previous treatment and does not require the use of reactive substances, with low economical cost.^{17,18}

Regarding Zn^{++} , an increment of 32.9% was found in the cases after diet supplementation with zinc methionine (5.4 g/day/horse for six months). Zinc is the second metallic ion most abundant in live organisms according to literature; it favors hoof integrity because it speeds up wound cicatrization, increases speediness of epithelial tissue repairing and maintains cellular integrity in equine and bovine. Zinc has also been used in other animal models, as rats and pigs, in which produces improvement of the immune system.^{19,20}

When Zn^{++} is found in an inorganic form it is not absorbed due to the presence of antagonists (cooper, cadmium, calcium and iron) in food, capable to reduce its bio-availability. Therefore, Zn^{++} sources in compounds avoid its interaction with other elements, as it happens with zinc methionine.^{11,20} However, there is not much information about the effects of this quelate on foot disorders in equine.^{2,9,10} Contrary, it has been proved in bovine that zinc methionine treatment increases 4.8% milk production and reduces significantly foot treatment costs.^{20,21}

Zinc methionine induced higher keratin production according to the aforementioned. This increase was measured indirectly by assessing S increase (68.4%), which is part of cysteine, amino acid that gives stability to hard keratin.^{19,22} So, it is demonstrated that Zn^{++} deficiency decreases formation of keratin filaments, necessary for keratinocyte development and differentiation.²²

Concluding, hoofs with higher quality were achieved by the zinc methionine dose added to equine diet, since cracks and fissures disappeared.

veterinaria, como técnica alternativa para hacer morfología y análisis químico al mismo tiempo.

El casco de los equinos está constituido por queratina, cuya función es proteger; su formación es parte de un proceso de diferenciación celular: la queratinización, que transforma las células epiteliales vivas en células cornificadas, células estructuralmente estables sin actividad metabólica.^{13,14} La dermis es el estrato que proporciona los nutrimentos (vitaminas, minerales y hormonas) que modulan y controlan la diferenciación celular en la epidermis.

En este trabajo se observa que la metionina de zinc produce clara y considerable mejoría del casco de caballo, con mayor organización de su morfología (cuernos tubulares e intertubulares definidos y compactos). Aunque sólo se analizó el estrato medio por ser el de mayor grosor, es evidente mayor calidad en todo el casco; en consecuencia, esto le permite efectuar todas sus funciones biomecánicas y de protección, conferidas por la dureza e insensibilidad, crecimiento y regeneración de la muralla y adaptación al medio externo.^{2,15}

De los elementos analizados (Fe^{++} , Cl^- , Ca^{++} , P , K^+ , S , Mg^{++} , Zn^{++} , Si , Na^{++} y Cu^{++}) con EDX, se encontró que sólo incrementaron S y Zn^{++} . Aunque el Cl^- , Ca^{++} y Na^{++} fueron mayores a 0.1%, no se observó tendencia hacia la disminución o aumento después del tratamiento. No se detectó Fe^{++} , P , K^+ , Mg^{++} , Si y Cu^{++} por sus concentraciones menores a 0.1%, por lo que se recomienda realizar su cuantificación por WDX, para concentraciones menores a 0.01% Wt, o por espectroscopía de fuerza atómica (EFA), que cuantifica en el orden de partes por millón en la muestra.¹⁶ Sin embargo, las ventajas del microanálisis con EDX, en comparación con EFA, es que se hace de manera rápida, sin tratamiento previo y no requiere el uso de reactivos, con bajo costo económico.^{17,18}

Con respecto al Zn^{++} , se encontró incremento de 32.9% en los cascos de los caballos, después de complementar la dieta con metionina de zinc (5.4 g/día/caballo por un periodo de seis meses). De acuerdo con la literatura, el zinc es el segundo ión metálico más abundante encontrado en organismos vivos, favorece la integridad del casco, pues acelera la cicatrización de heridas, aumenta la velocidad de reparación del tejido epitelial y mantiene la integridad celular en equinos y bovinos. También se ha empleado en otros modelos animales, como ratas y cerdos, en los que produce mejoría del sistema inmunitario.^{19,20}

Cuando el Zn^{++} se encuentra de manera inorgánica no se absorbe, esto se atribuye a la presencia de antagonistas (cobre, cadmio, calcio y hierro) en los alimentos, capaces de reducir su biodisponibilidad. Por tanto, las fuentes de Zn^{++} en forma de complejos evitan que éste interactúe con otros elementos, como

Acknowledgements

Dr. Saul Renan Leon Hernandez is thanked for his support in the statistical analysis of data.

Referencias

1. Lewis LD. Equine clinical nutrition. Philadelphia: Lea and Febiger, 1995.
2. Hood DM. Demands of equine foot function and hoof growth require proper nutrition. *Trace Miner Focus* 2002;8:1-8.
3. Ott EA, Asquith RL. Trace mineral supplementation of yearling horses. *J Anim Sci* 1995;73:466-471.
4. Ott EA, Johnson EL. Effect of trace mineral proteinates on growth and skeletal and hoof development in yearling horses. *J Equine Vet Sci* 2001;21:16-20.
5. Wichert B, Frank T, Kiezele E. Zinc, copper and selenium intake and status of horse in Bavaria. *J Nutr* 2002; 132:1176-1777.
6. Starcher BC, Hill CH, Madanas JG. Effect of zinc deficiency on bone collagenase and turnover. *J Nutr* 1980; 110:2095-2102.
7. Spears JW. Zinc methionine for ruminants: relative bioavailability of zinc in lambs and effects of growth and performance of growing helpers. *J Anim Sci* 1989; 67:835-843.
8. Wedekind KJ, Hortin EA, Baker HD. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulphate and zinc oxide. *J Anim Sci* 1992; 70: 178-187.
9. Mills CF. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc. *J Anim Sci* 1987;65:1702-1711.
10. Wedekind KJ, Horton AE, Baker DH. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. *J Anim Sci* 1992;70:176-187.
11. Hidioglou M, Williams CL. Mineral and amino acid composition of beef cattle hooves. *Amer J Vet Res* 1986;47:301-303.
12. Swinkels JW. Availability of zinc from an amino acid chelate in Zn depleted pig. PhD Dissertation. Blacksburg (Virginia) USA: Poly-tech Institute and State University, 1992.
13. Mülling CH, Bragulla S, Reese KD, Steinberg W. How structures in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors. *Anat Hist Embryo* 1999;28:103-108.
14. Mülling C. Three-dimensional appearance of bovine epidermal keratinocytes in different stages of differentiation revealed by cell maceration and scanning electron microscope investigation. *Folia Morphol* 2000; 59:239-246.
15. Bragulla H. Fetal development of the segment-specific

sucede con la metionina de zinc.^{11,20} Sin embargo, hay poca información de los efectos de este quelato en las afecciones podales en equinos.^{2,9,10} En cambio, en bovinos se ha demostrado que el tratamiento con metionina de zinc incrementa la producción de leche 4.8%, y logra de manera significativa la reducción de los costos de los tratamientos podales.^{20,21}

De acuerdo con lo anterior, la metionina de zinc indujo mayor producción de queratina, que se midió de manera indirecta al determinar un aumento de S (68.4%), que forma parte de la cisteína, aminoácido que proporciona estabilidad a la queratina dura.^{19,22} Por tanto, se demuestra que la insuficiencia de Zn⁺⁺ disminuye la formación de los filamentos de queratina, necesarios para el desarrollo de los queratinocitos y su diferenciación.²²

En conclusión, con la dosis de metionina de zinc que se añadió en la dieta de los equinos se lograron cascos de mayor calidad, ya que desaparecieron las quebraduras y fisuras.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Saúl Renan León Hernández su apoyo en el análisis estadístico de los datos.

papillary body in the equine hoof. *J Morphol* 2003; 258:207-224.

16. Timofeeff NM, Lowenstein KT, Blackburn HW. ESEM-EDS: an improved technique for major element chemical analysis of fluid inclusions. *Chem Geol* 2000;164:171-182.
17. Danilatos GD. Environmental scanning electron microscopy and microanalysis. *Mikrochim Acta* 1994;114:143-155.
18. Vázquez Nin G, Echeverría O. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. México (DF): Fondo de Cultura Económica, 2000.
19. Van Heugten E, Spears JW, Kegley EB, Ward JD, Qureshi MA. Effects of organic forms of zinc on growth performance, tissue zinc distribution, and immune response of weanling. *J Anim Sci* 2003; 81:2063-2071.
20. Martín OG, Rutter B. Afecciones podales en bovinos. Monografía final del curso de nutrición en la intensificación. Buenos Aires (Argentina): Facultad de Veterinaria. Universidad de Buenos Aires, 2003.
21. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th revised ed. Washington, DC: Natl Acad Sci 2001.
22. Tomlinson DJ, Mulling CH, Fakler TM. Formation of keratins in the bovine claw: Roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity. *J Dairy Sci* 2004; 87:797-809.