

1. INTRODUCCIÓN

El selenio (*Se*) es importante en mamíferos ya que es parte de diversas selenoproteínas de las cuales destacan las glutatión peroxidasas y las yodotironina deydinasas por su función. Las primeras protegen a las membranas celulares del daño oxidativo reduciendo radicales libres a compuestos no dañinos (Lei *et al.*, 2007), mientras que las segundas participan en el metabolismo de las hormonas tiroideas activando e inactivando la forma biológicamente más activa (triyodotironina; Behne y Kyriakopoulos, 2001). Sus varias funciones ejercidas a través de las selenoproteínas explica la aparición de los trastornos observados cuando los animales consumen dietas con bajo contenido de *Se*. Los problemas más comunes en rumiantes con deficiencia de *Se* son la enfermedad del músculo blanco (*EMB*) en animales jóvenes, problemas reproductivos (retención placentaria, endometritis, quistes ováricos, infertilidad), mastitis y disminución en la respuesta inmune (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001; Hemingway, 2003; Sánchez *et al.*, 2007).

En rumiantes la mayor parte del *Se* consumido se absorbe en intestino delgado y otra parte es volatilizada y eliminada junto con otros gases a través del eructo (López *et al.*, 1969; Koenig *et al.*, 1997). Para que el *Se* consumido cumpla con sus funciones fisiológicas debe llegar al intestino delgado en una forma que pueda ser absorbido. Sin embargo, la actividad de las bacterias ruminales tienen un efecto en la biodisponibilidad del *Se* inorgánico, ya que pueden incorporar en forma de selenoaminoácidos una parte del *Se* consumido (como selenocistina, selenoetionina, selenohomocisteína y selenometionina) sustituyendo azufre por *Se*, por lo que éste llegaría al intestino delgado en forma orgánica para ser absorbido (Hidirogluo *et al.*, 1968; Serra *et al.*, 1994a). También las bacterias ruminales pueden reducir parte importante del *Se* consumido a selenuro o *Se* elemental (Hudman y Glenn, 1984), compuestos no absorbidos en la parte intestinal por lo que son excretados en las heces (Langlands *et al.*, 1986).

Las recomendaciones del NRC (2007) del requerimiento de *Se* para ovinos en crecimiento fueron calculadas mediante el método factorial considerando el peso vivo, la ganancia de peso esperada y el coeficiente de absorción de este mineral. Este último varía en función de la dieta ya que si es a base de forraje la absorción aparente del *Se* es considerablemente menor a base

de grano (Koenig *et al.*, 1997). Así, con las primeras el requerimiento de *Se* es mayor que con las segundas para un mismo tipo de animal.

Estas recomendaciones del NRC no consideran los cambios provocados en la fermentación ruminal o en la utilización de nutrientes. Se han observado cambios en el perfil de *AGV*, producción de masa bacteriana y concentración de protozoas ruminales con la adición de *Se* en dietas para ovinos (Hidiroglou y Lessard, 1976; Serra *et al.*, 1994; Naziroglu *et al.*, 1997). Además, ha cambiado la utilización de nutrientes debido a la adición de *Se* complementario en las dietas (Bravo y Bañuelos, 1994; Hernández-Calva *et al.*, 2007).

Por lo anterior es probable que en ovinos la adición a la dieta de cantidades de *Se* inorgánico inferiores a la concentración máxima tolerable, cambia la población microbiana en rumen alterando la concentración de productos de la fermentación y la utilización de nutrientes, lo cual puede cambiar el requerimiento de *Se* para ovinos en crecimiento.

Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo general evaluar los cambios ocurridos en variables de la fermentación ruminal, utilización de nutrientes y balance de *Se* en ovinos que reciben tres cantidades de *Se* inorgánico en dietas con 50 y 69% de grano de maíz.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia nutricional del *Se*

El *Se* es un microelemento esencial en la nutrición animal y humana ya que forma parte estructural de las selenoproteínas, son proteínas donde el *Se* ha sido incorporado por codificación genética en forma de selenocisteína (*Sec*) (Stadtman, 1991). Ejemplos de selenoproteínas son las glutatión peroxidases (*GPX*), las deiodinasas (*DI*), las tioredoxina reductasas (*TR*) y la selenofosfato sintetasa, enzimas que participan en reacciones redox (Behne y Kyriakopoulos, 2001).

Se han identificado cuatro glutatión peroxidases que contienen *Sec*, las cuales reducen peróxido de hidrógeno y peróxido lipídico. La *GPXI*, la más abundante y estudiada, fue descubierta en 1957 como una enzima de los eritrocitos que protege a la hemoglobina del daño oxidativo, pero existe en casi todos los tejidos (Lei *et al.*, 2007). Las deiodinasas son enzimas que participan en el metabolismo de las hormonas tiroideas, las *DI-I* y *DI-II* transforman tiroxina (*T4*) a triyodotironina (*T3*), y esta última es la principal forma activa de estas hormonas. La inactivación de *T4* y *T3* es realizada por la *DI-III*, resultando en las formas inactivas rT3 y T2 (Köhrle, 2000). Las tioredoxina reductasas catalizan la producción de tioredoxina reducido a partir de tioredoxina oxidado, el cual es necesario para varios sistemas dependientes de reacciones redox (por ejemplo, síntesis de *ADN* y regulación redox de factores de transcripción) y en la regulación del crecimiento celular e inhibición de apoptosis. La selenofosfato sintetasa participa en la síntesis de selenofosfato, donador de *Se* para la síntesis de *Sec* (Behne y Kyriakopoulos, 2001).

La selenoproteína *P* parece funcionar como proteína transportadora de *Se* (Burk *et al.*, 2003), mientras que la selenoproteína *W* posiblemente actúa como antioxidante en los músculos cardíaco y esquelético (Yeh *et al.*, 1997). Otras selenoproteínas han sido identificadas (*H*, *K*, *M*, *N*, *O*, *R*, *S*, *T*, *V* y *15kDa*), sin embargo su función es desconocida (Beckett y Arthur, 2005).

2.2 Trastornos relacionados con la deficiencia de *Se* en rumiantes

Se ha diagnosticado la deficiencia de *Se* en forrajes en Argentina, Bolivia, Colombia, Costa Rica, República Dominicana, Guatemala, Nicaragua y Venezuela. En promedio, 56% de las muestras analizadas de forrajes de estos países tienen menos de 0.1 ppm de *Se* (McDowell *et al.*, 1997). Otros países con deficiencia de *Se* son Finlandia, Nueva Zelanda, China, Estados Unidos y Japón (Henry y Ammerman, 1995). En México se han encontrado suelos y forrajes deficientes en *Se* en los estados de Veracruz, Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala y Puebla (Huerta, 1997; Ramírez-Briebiesca *et al.* 2004). La biodisponibilidad del *Se* para las plantas está determinada por las características del suelo (pH, textura, contenido de materia orgánica y condiciones redox), forma química del elemento y la presencia de otros iones competidores (Fordyce, 2007). La mayoría de los suelos en regiones tropicales son ácidos, lo cual reduce la absorción de *Se* por las plantas al formarse complejos entre el hierro férrico y el selenito (McDowell *et al.*, 1997).

La participación de las selenoproteínas en diversos procesos metabólicos puede explicar las manifestaciones clínicas relacionadas con el consumo deficiente de *Se*. En rumiantes jóvenes la deficiencia de *Se* causa degeneración de los músculos estriados conocida como enfermedad del músculo blanco (*EMB*). En corderos y cabritos esta degeneración se considera la principal causa de muerte en los primeros 20 días de edad en áreas con deficiencia de *Se* (Ramírez-Briebiesca *et al.*, 2001; Ramírez-Briebiesca *et al.*, 2004). En becerros la degeneración también afecta el músculo cardíaco, ocurriendo la muerte por insuficiencia cardíaca (De Aluja y Adame, 1977).

La deficiencia de *Se* en vacas y ovejas se ha asociado con retención placentaria, endometritis, quistes ováricos y baja tasa de concepción (Hemingway, 2003). La aplicación intramuscular de *Se* y vitamina E en vacas 40-60 días antes del parto ha mejorado el periodo de expulsión placentaria, periodo de involución uterina, intervalo parto-inseminación y número de servicios por concepción (Sattar *et al.*, 2007).

La deficiencia de *Se* también afecta la respuesta inmune ya que disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa 1 la cual protege a los neutrófilos de los radicales que ellos mismos producen para destruir a los microorganismos patógenos (Arthur *et al.*, 2003). Este proceso es importante para mantener la salud de la glándula mamaria, ya que la administración de *Se* en

regiones deficientes ha disminuido la cantidad de células somáticas y el porcentaje de incidencia de mastitis clínica en cabras y vacas lecheras (Smith *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2007). La administración de *Se* también ha incrementado la respuesta inmune de corderos inoculados con el virus de la parainfluenza *PI₃V* (Reffett *et al.*, 1988).

2.3 Biodisponibilidad del *Se*

La biodisponibilidad se define como el grado al cual un nutriente ingerido a través de alguna fuente en particular es absorbido en una forma que pueda ser utilizado en el metabolismo del animal (Ammerman *et al.*, 1995). La actividad relativa de las fuentes de *Se* para las funciones biológicas depende del criterio de evaluación. La actividad de la glutatión peroxidasa es uno de los mejores indicadores de contenido y utilización de *Se*. La concentración de *Se* en tejidos o la respuesta de los animales en la prevención o corrección de patologías asociadas a la deficiencia de *Se* (*EMB*) también pueden usarse como indicadores de biodisponibilidad del elemento (Henry y Ammerman, 1995).

La referencia estándar comúnmente usada para evaluar la biodisponibilidad de *Se* es el selenito de sodio, con base en la utilización inmediata para sus funciones biológicas (Henry y Ammerman, 1995). Actualmente las únicas fuentes de *Se* complementario permitidas por la U.S. Food and Drug Administration (*FDA*) son selenito y selenato de sodio, y levadura enriquecida con *Se* (NRC, 2007). La biodisponibilidad de *Se* para incrementar la concentración de *Se* en leche y la actividad de glutatión peroxidasa en suero, es similar para selenito y selenato de sodio en bovinos y ovinos (Podoll *et al.*, 1992; Ortman y Pehrson, 1999). Pero la biodisponibilidad del selenato de sodio fue 33% más alta que la del selenito de sodio basada en el incremento de *Se* en suero, hígado y riñones en ovinos (Henry *et al.*, 1988). El *Se* de levadura enriquecida tiene mayor biodisponibilidad respecto a fuentes inorgánicas en términos de su capacidad para elevar y mantener la concentración de *Se* en sangre, plasma y leche (Ortman y Pehrson, 1999; Knowles *et al.*, 1999 ; Davis *et al.*, 2002). La concentración de *Se* en diversos tejidos (sangre, músculo esquelético, hígado, riñones, bazo, corazón, pulmones e intestino delgado) a partir de selenometiona es superior que la observada con selenito en ovinos (Ehlig *et al.*, 1967). Una parte de la selenometionina consumida es metabolizada directamente a formas reactivas de *Se* pero otra parte es almacenada en proteínas en tejidos ocupando el lugar de la metionina (Schrauzer, 2000).

2.4 Metabolismo ruminal del Se

2.4.1 Incorporación de Se en bacterias ruminales

En investigaciones *in vivo* e *in vitro* se ha encontrado que las bacterias ruminales metabolizan Se inorgánico y lo incorporan en su proteína bacteriana (Hidiroglou *et al.*, 1968; Paulson *et al.*, 1968; Whanger *et al.*, 1978; Serra *et al.*, 1994a; Kim *et al.*, 1997; Koenig *et al.*, 1997). La incorporación de Se en proteína bacteriana está relacionada con el consumo previo del elemento; la actividad de ^{75}Se por gramo de proteína bacteriana es mayor con una dieta deficiente en Se que con una no deficiente (Hidiroglou *et al.*, 1968). Sin embargo, cuando el contenido de Se es expresado por unidad de masa bacteriana la concentración de Se es mayor en ovinos que reciben selenito o selenato que en ovinos sin Se adicional (Serra *et al.*, 1994a).

Hay menor concentración de bacterias ruminales con una dieta deficiente en Se (50% de la población observada con una dieta complementada con selenito) y la síntesis de proteína microbiana puede disminuir cuando hay menor disponibilidad de Se (Hidiroglou *et al.*, 1968). Sin embargo, Serra *et al.* (1994b) no observaron diferencia significativa en la producción de masa bacteriana entre ovinos que reciben selenato o selenito y ovinos sin Se.

El mayor incremento de Se bacteriano ocurre durante las primeras 3-4 horas después del consumo de Se inorgánico, indicando la rapidez de incorporación por las bacterias ruminales (Hidiroglou *et al.*, 1968; Serra *et al.*, 1994a). A diferencia del selenato, el Se a partir de selenito es incorporado por las bacterias inmediatamente después de haber sido consumido, pero al pasar el tiempo el Se de ambas fuentes es incorporado en la misma magnitud (Serra *et al.*, 1994a). Es posible que el selenato sea reducido a selenito para luego ser incorporado en masa bacteriana (Paulson *et al.*, 1968).

Las bacterias incorporan Se principalmente en forma de selenometionina (Hidiroglou *et al.*, 1968), pero se ha encontrado selenocisteína y selenohomocisteína en cultivos de *Selenomonas ruminantium* y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985). El Se orgánico en bacterias ruminales puede estar disponible para su absorberse al llegar al intestino delgado (Hidiroglou *et al.*, 1968; Whanger *et al.*, 1978), pero hay poca información referente a la biodisponibilidad del Se incorporado en bacterias ruminales. Serra *et al.* (1997) alimentaron ratones con una dieta deficiente en Se más masa bacteriana ruminal con 500 ppb de Se y concluyeron que el Se bacteriano obtenido de líquido ruminal de ovinos no está

totalmente disponible para la absorción intestinal en ratones. Con el *Se* bacteriano lograron aumentar la concentración de *Se* en sangre (15%), corazón (27%), riñones (22%), cerebro (11%), pulmones y vaso (10%) y músculo (9%), respecto a los ratones testigo; sin embargo el incremento fue mayor con selenito.

La cantidad de *Se* en masa bacteriana es mayor cuando se usan dietas con mayor contenido de carbohidratos de fácil fermentación y también con fuentes orgánicas de *Se* (Cuadro 1). La incorporación de *Se* en bacterias es menor si la dieta tiene un alto contenido de forraje, mientras que con dietas con alto contenido de grano la incorporación es mayor (Koenig *et al.* 1997). Esto puede deberse a la capacidad de las especies de bacterias predominantes en cada caso para incorporar *Se*. *Prevotella ruminicola*, que predomina en dietas a base de forraje, no incorporó *Se* en selenoaminoácidos; mientras que *S. ruminantium* y *B. fibrisolvens* predominan en dietas a base de grano y pueden incorporarlo (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985).

2.4.2 Reducción bacteriana de *Se*

También se ha propuesto que la biodisponibilidad del *Se* consumido disminuye por la reducción del elemento por las bacterias ruminales, generándose compuestos de menor biodisponibilidad para el animal (Whanger *et al.*, 1978; Langlands *et al.*, 1986). Uno de los productos de la fermentación ruminal de carbohidratos es el ión hidrógeno (H^+) el cual es sustrato de bacterias metanogénicas, como *Methanobrevibacter ruminantium*, para la síntesis de metano (Baldwin y Allison, 1983). Esto hace al ambiente ruminal propicio para la reducción de *Se* inorgánico. Dos moles de H^+ son consumidos por mol de selenito reducido a *Se* elemental, mientras que un mol más de H^+ es usado para reducir *Se* elemental a selenuro (Kim *et al.*, 1997). La cantidad de *Se* reducido en rumen aumenta conforme el consumo de materia orgánica es mayor (Langlands *et al.*, 1986).

La reducción de *Se* inorgánico ha sido estudiada en sedimentos y depósitos fangosos de afluentes de desechos industriales con alto contenido de *Se* tóxico (selenato y selenito). Se han aislado bacterias anaerobias que pueden usar selenato (*Enterobacter hormaechei*) y selenito (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Enterobacter amnigenus*) como aceptores de electrones durante su respiración, obteniéndose

como resultado *Se* elemental insoluble no tóxico (Se^0) en forma de partículas esféricas visibles al microscopio de barrido de electrones (Oremland, *et al.*, 1989; Siddique *et al.*, 2007).

Cuadro 1

Porcentaje de *Se* que fluye diariamente a duodeno incorporado en masa bacteriana respecto a la cantidad consumida o administrada diariamente.

Fuente de <i>Se</i>	Tipo de dieta ¹	
	Forraje	Grano
Dieta	18	33
[⁷⁷ Se]-Levadura	30	53
[⁸² Se]-Selenito	23	42

1/ Forraje: 77% de heno de alfalfa y 380 ppb de *Se*; Grano: 80% de grano de cebada y con 270 ppb de *Se*.

La reducción ruminal de *Se* inorgánico es frecuentemente mencionada en la literatura, pero las evidencias son escasas. Aparentemente la incorporación y reducción de *Se* es diferente dependiendo de la especie bacteriana presente en el rumen. Usando ⁷⁵[*Se*]-selenito, se ha demostrado que *S. ruminantium* y *B. fibrisolvens* incorporan *Se* en forma de selenoaminoácidos, lo cual no se observó con *P. ruminicola*. Sin embargo, las tres bacterias pudieron reducir selenito a *Se* elemental (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985).

2.4.3 *Se* y fermentación ruminal

Kim *et al.* (1997) incubaron in vitro medios de cultivo anaerobios con 0.2 y 2 ppm *Se* usando selenometionina, con y sin salvado de trigo. Sin salvado de trigo la concentración total de ácidos grasos volátiles (*AGV*) no fue diferente entre tratamientos; sin embargo, la concentración de *AGV* con 2 ppm *Se* a las 12 h de fermentación fue 17% y 19% superior respecto a 0 y 0.2 ppm *Se*, mientras que a las 24 h fue 35% y 47% superior. Con salvado de trigo la adición de 2 ppm de *Se* disminuyó significativamente la producción total de *AGV* únicamente a las 12 h de fermentación. La concentración de butirato fue significativamente mayor con 0 ppm *Se* respecto a los otros tratamientos. A las 24 h la concentración total de *AGV* no tuvo cambios significativos, pero la concentración de propionato y butirato con 0.2 ppm fue significativamente mayor que con los otros tratamientos. En el mismo estudio, los autores adicionaron a los medios de cultivo 50, 2 y 2 ppm *Se* a partir de *Se* elemental, selenito y selenometionina. La concentración total de *AGV* fue significativamente mayor con

selenimetionina, y solo butirato no tuvo cambios significativos en su concentración. La proporción de acetato incrementó significativamente con selenometionina respecto al selenito, mientras que la de butirato disminuyó. Los resultados de este estudio indican que la adición de *Se* puede influir en la fermentación ruminal en función de la concentración, fuente y el tipo de sustrato (Kim *et al.*, 1997)

En corderos que recibieron 0.2 ppm de *Se* inorgánico en la dieta (selenito y selenato) no hubo efecto sobre la producción de masa bacteriana en el rumen, aunque en corderos consumiendo selenito y selenato disminuyó la masa bacteriana de 19 y 17%, respecto al testigo. Los tratamientos tampoco cambiaron la producción total de *AGV*, aunque la concentración de *AGV*. Además se observó una correlación negativa (-0.78; $P < 0.05$) entre la concentración de *Se* en líquido ruminal y la producción de masa bacteriana en rumen (Serra *et al.*, 1994b). En dicho estudio los tratamientos no afectaron significativamente la digestibilidad total de nutrientes, aunque la digestibilidad total de la proteína mejoró 5% con selenito y la de la fibra se redujo 5% para *FDN* y 6% para *FDA* con selenato, respecto al testigo. Pero en otro estudio, la digestibilidad total de la *FDN* incrementó significativamente 34% respecto al testigo con 0.1 ppm *Se* en la dieta, mientras que con 0.2 ppm *Se* redujo hasta 76% de la digestibilidad en el testigo (Bravo y Bañuelos, 1994). Asimismo, con una concentración de 0.1 ppm *Se* la digestibilidad ruminal de la *FDN*, almidón y materia orgánica (*MO*) fue superior que con 0.3 ppm *Se*, con 0.18% de magnesio (*Mg*) en la dieta, lo cual no ocurrió con 0.32% de *Mg*, lo que indica una interacción de *Se* con otros minerales presentes en la dieta (Hernández-Calva *et al.*, 2007).

2.5 Balance de *Se* en rumiantes

En los estudios de balance de *Se* en rumiantes generalmente se considera su consumo y su excreción (heces y orina) para estimar su absorción aparente y retención en el organismo (Ehlig *et al.*, 1967; Serra *et al.*, 1994a; Koenig *et al.*, 1997; Ivancic y Weiss, 2001). Sin embargo, hay evidencias de la presencia de *Se* endógeno en heces proveniente principalmente de la secreción biliar (Langlands *et al.*, 1986) por lo que este se ha usado para estimar la absorción verdadera del elemento (Krishnamurti *et al.*, 1997).

2.5.1 Absorción

En bovinos y ovinos se ha propuesto un modelo cinético para el flujo y distribución del *Se* en el organismo (Figura 1; Ceballos y Wittwer, 1996). La absorción de *Se* en rumiantes ocurre principalmente en los intestinos (50-86% del total absorbido; Koenig *et al.*, 1997) y es menor que en no rumiantes (Spears, 2003) probablemente debido a la actividad reductora de las bacterias ruminales que generan *Se* elemental el cual no puede ser absorbido (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985). Selenocisteína y selenometionina son absorbidos mediante transporte activo, mientras que el selenito se absorbe por difusión simple y el selenato por un transporte mediado por sodio y compartido con azufre (NRC, 2005).

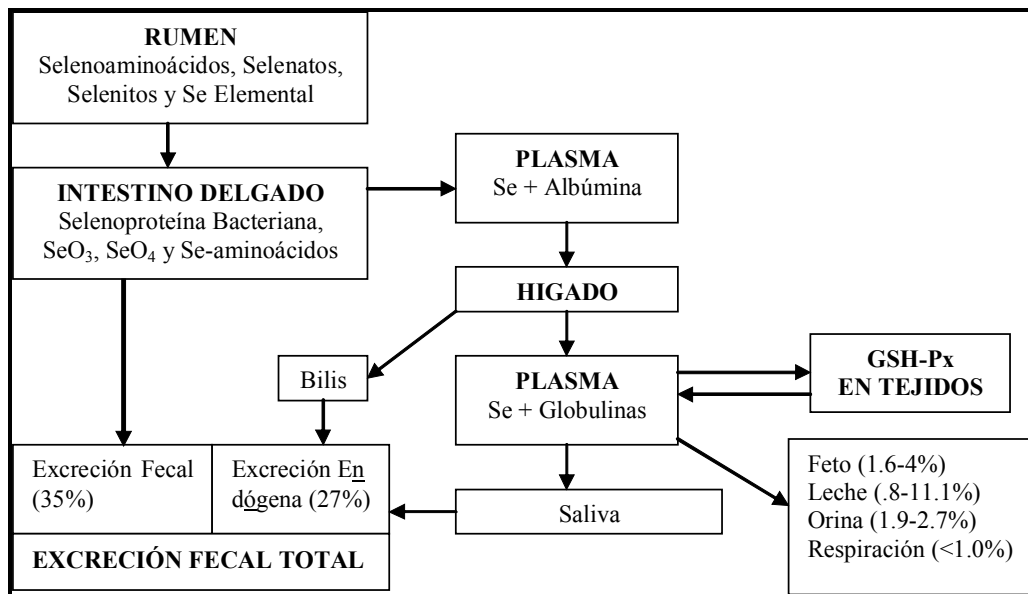


Figura 1

Modelo cinético para la distribución de *Se* en rumiantes.

2.5.2 Retención y distribución

El *Se* retenido se distribuye prácticamente en todo el organismo (Cuadro 2). En corderos se observó que los órganos que acumularon más *Se* fueron el hígado, los riñones y pulmones. Al expresarse la cantidad de *Se* por unidad de masa, el orden descendente de los órganos fue glándula adrenal, riñones, vesícula biliar, bazo, hígado, pulmones, corazón, sangre, salea, tracto gastrointestinal y canal (López *et al.*, 1969). Por su alta concentración de *Se* en condiciones de deficiencia los riñones y el bazo son órganos importantes en el metabolismo de *Se* (Wright y Bell, 1964). La retención total en riñones mostró ser mayor que en hígado

cuando el consumo de *Se* era deficiente mientras que la situación se revirtió con la adición de *Se* complementario. La máxima concentración de *Se* en órganos se ha observado con una dieta deficiente en *Se* (López *et al.*, 1969). Aparentemente existe una jerarquía en la distribución de *Se* de tal forma que el cerebro, glándulas endocrinas y órganos reproductivos tienen prioridad sobre el corazón, músculo e hígado cuando hay deficiencia de *Se* (Sunde, 1997).

2.5.3 Excreción

La principal vía de excreción de *Se* en los rumiantes son las heces. La excreción fecal de *Se* corresponde predominantemente a *Se* de la dieta que ha sido reducido a formas no disponibles (*Se* elemental) durante su paso a través del rumen. Otra porción del *Se* fecal corresponde a *Se* endógeno que proviene principalmente de la secreción biliar (Langlands *et al.*, 1986).

La orina es la vía de excreción del *Se* absorbido (López *et al.*, 1969), el cual se excreta como dimetilselenuro, ión trimetilselenonium y un compuesto de *Se* no identificado (Sunde, 1999). Trimetilselenonium representó 10% del *Se* en orina en ratas deficientes en *Se*, mientras que en ratas no deficientes representó la principal forma de *Se* urinario (Nahapetian *et al.*, 1983).

El *Se* eliminado por volatilización proviene de los pulmones y de la eliminación de gases ruminales a través del eructo. El dimetilselenuro es un producto volátil producido en el hígado durante el metabolismo del *Se* inorgánico y transportado a través de la sangre hasta los pulmones donde es eliminado. Dimetilselenuro también puede ser formado en rumen a partir de selenuro metálico y compuestos metilados, y puede ser absorbido en la sangre y eliminado a través del tracto respiratorio junto con el dimetilselenuro producido en el hígado (Ganther *et al.*, 1966; López *et al.*, 1969).

En hembras lactantes el *Se* también es eliminado a través de la leche y representa la principal fuente de *Se* para el recién nacido además de sus reservas corporales (Ortman y Pehrson, 1999; Elghany *et al.*, 2008).

2.5.4 Factores que afectan el balance de *Se*

Consumo de *Se*

La retención de ⁷⁵*Se* en cuerpo completo fue superior en ovinos alimentados con una dieta con 14 ppb *Se* y disminuyó conforme incrementaba el contenido de *Se* en la dieta (264, 514 y

5,014 ppb). La excreción urinaria y volátil de *Se* incrementó conforme incrementaba la concentración de *Se* en la dieta. La excreción fecal no mostró cambios pero fue la principal vía de eliminación de *Se* con dietas con 14 y 264 ppb, pero la excreción urinaria fue superior a partir de 514 ppb en la dieta (López *et al.*, 1969).

Cuadro 2
Concentración de *Se* en órganos de corderos complementados con selenito de sodio o selenometionina (ppb).

Órgano o tejido	Heno de alfalfa ¹	Selenito de sodio ²	Selenometionina ²
Sangre	367	103	143
Plasma	141		
Músculo esquelético	72	17	35
Piel y lana		39	113
Grasa mesentérica		14	16
Hígado	178	490	600
Riñones	997	515	723
Bazo	392	136	201
Corazón	222	61	105
Cartílago		23	34
Lengua		38	88
Íleo		89	193
Duodeno		95	172
Pulmones	206	104	147
Páncreas	297		
Glándula mamaria	96		

1/ Heno con 154 ppb (Krishnamurti *et al.*, 1997).

2/ Consumo de 0.4 mg *Se* por animal por día a partir de selenito y selenometionina (Ehlig *et al.*, 1967).

Lo anterior fue corroborado posteriormente al observarse que el *Se* excretado en heces en ovejas consumiendo una dieta con 10 ppb representó 55% del *Se* consumido, mientras que con una dieta con 154 ppb representó 40%. En orina se excretó 7% del *Se* consumido con 10 ppb mientras que con 154 ppb la excreción por esta vía fue de 15%. Por lo que la absorción y retención se incrementa con dietas deficientes en *Se* (Krishnamurti *et al.*, 1997).

También el balance de *Se* en el organismo afecta la excreción del elemento en heces. Langlands *et al.* (1986) observaron mayor excreción fecal de *Se* en ovinos con balance negativo de *Se*, es decir cuando fueron cambiados de una dieta con 157 ppb a otra con 52 ppb. Esta mayor excreción fecal pudo haberse originado a partir de la movilización de *Se* de tejidos a consecuencia del balance negativo, arribando al intestino a través de secreciones biliares.

Relación forraje:concentrado

La absorción y retención de *Se* fue mayor en un estudio con ovinos consumiendo una dieta con 78% grano en comparación con ovinos consumiendo una dieta 77% forraje (Cuadro 3; Koenig *et al.*, 1997). La disponibilidad del *Se* de fuentes orgánicas e inorgánicas parece cambiar por la composición de la dieta consumida ya que influye directamente en el pH y población microbiana en el rumen. Una de las bacterias predominantes en dietas a base de forraje es *Prevotella ruminicola* (Latham *et al.*, 1972), bacteria con gran capacidad de reducir *Se* a *Se* elemental, el cual prácticamente no se absorbe en intestinos (Hudman y Glen, 1985).

Fuente de *Se*

En un estudio con corderos en el que se usó selenito y selenometionina como fuentes de *Se* complementario se observó mayor retención del elemento con la fuente orgánica que con el selenito, aunque no se observaron diferencias en absorción (Ehlig *et al.*, 1967). Sin embargo, en otro estudio donde se administró *Se* inorgánico (^{82}Se -selenito) y orgánico (^{77}Se -levadura) se observó mayor absorción y retención de *Se* a partir de la fuente inorgánica que a partir de levadura, indicando que las formas inorgánicas pueden ser tan disponibles como las fuentes orgánicas (Koenig *et al.*, 1997). En bovinos el consumo de levadura enriquecida con *Se* incrementó la concentración de *Se* en sangre, plasma y leche respecto a selenito y selenato de sodio (Knowles *et al.*, 1999; Ortman y Pehrson, 1999; Davis *et al.*, 2002).

En estudios con ovinos, bovinos y caballos no se han observado diferencia entre fuentes inorgánicas (selenato vs. selenito) respecto a su absorción y retención (Serra *et al.*, 1994a) o a la concentración de *Se* y actividad de glutatión peroxidasa en suero (Podoll *et al.*, 1992). Sin embargo, ovinos consumiendo 6 ppm de *Se* en la dieta presentaron mayor concentración de *Se* en hígado, riñones y suero con selenato de sodio respecto al selenito, con lo que los autores

estimaron una biodisponibilidad para el selenato 33% superior a la del selenito (Henry *et al.*, 1988).

Consumo de azufre

La absorción de *Se* también es alterada por el consumo de azufre (*S*). Al incrementar linealmente la concentración de *S* (a partir de sulfato de magnesio y calcio) hasta 0.4% en la dieta de vacas lecheras con 0.1 y 0.3 ppm *Se* (a partir de selenato de sodio), Ivancic y Weiss (2001) observaron una reducción en la digestibilidad aparente y verdadera de *Se*, así como en su concentración en plasma. También se observó un incremento en la excreción fecal de *Se* por lo que los autores atribuyeron este efecto del *S* a una mayor reducción de *Se* en rumen y a una menor incorporación bacteriana a formas orgánicas. Además, el selenato utiliza la misma vía de absorción intestinal que el molibdato y el sulfato por lo que pudo haber un efecto antagónico del sulfato con el selenato (Underwood y Suttle, 1999).

Cuadro 3

Balance de *Se* en ovinos en función del tipo de dieta y la fuente de *Se*¹.

Fuente de <i>Se</i>	Heces	Absorción	Orina	Retención
<i>Dieta a base de forraje (77% heno de alfalfa)</i>				
⁸² [<i>Se</i>]-Selenito	63	37	7	29
⁷⁷ [<i>Se</i>]-Levadura	69	31	9	22
<i>Dieta a base de grano (78% grano de cebada)</i>				
⁸² [<i>Se</i>]-Selenito	51	49	8	41
⁷⁷ [<i>Se</i>]-Levadura	54	46	10	36

1/ Valores expresados como % de la dosis administrada.

Otros componentes de la dieta

El grado de exposición de *Se* de la dieta a la actividad bacteriana depende de la degradabilidad de la fuente de proteína. La proporción de *Se* que llegue al intestino disponible para ser absorbido será diferente en alimentos con la misma concentración de *Se* pero con diferente degradabilidad ruminal (van Ryssen *et al.*, 1997).

La absorción de *Se* se reduce cuando las dietas contienen alta o baja concentración de calcio (*Ca*). En vacas lecheras alimentadas con 4 g o 12.5 g *Ca* por kg de materia seca se observó una disminución de la absorción de *Se* en un 50% respecto a la observada con 4 g *Ca* por kg MS (Harrison y Conrad, 1984). Aunque este efecto no fue observado en becerros alimentados con 1.7 o 23.5 g *Ca* por kg MS (Alfaro *et al.*, 1978).

Ovejas alimentadas con trébol blanco con alto contenido de glucósidos cianogénicos y sus crías presentaron menor actividad de glutatión peroxidasa que las ovejas alimentadas con trébol con bajo contenido de estos compuestos. Los glucósidos cianogénidos pueden ser metabolizados a cianuro en rumen y el cianuro puede incrementar la excreción urinaria (Spears, 2003).

2.6 Toxicidad

El *Se* es un elemento muy tóxico cuando es consumido en exceso por los animales. La intoxicación aguda es causada por la ingestión de plantas acumuladoras de *Se* o por la administración accidental de grandes cantidades de *Se* complementario (NRC, 1983). Se caracteriza por depresión, salivación, disnea, diarrea, dolor abdominal y muerte repentina. Esta forma de toxicidad no es común en campo ya que los animales evitan el consumo de plantas acumuladoras de *Se*, a menos que no haya disponibilidad de forraje (NRC, 1983; Aitken, 2001).

La intoxicación crónica (también llamada Enfermedad del Alkali) se presenta cuando los animales consumen granos o pastos que contienen entre 5 y 40 ppm de *Se* por periodos prolongados de tiempo (semanas o meses). Los animales presentan caída de pelo, falta de apetito, pérdida de peso, diarrea, infertilidad, pezuñas deformes, lesiones en los cuernos y cirrosis hepática. La intoxicación crónica puede llegar a la emaciación y la muerte (NRC, 1983; Aitken, 2001).

No está bien establecido el mecanismo mediante el cual el *Se* llega a ser tóxico debido a las propiedades químicas de los diferentes compuestos de *Se*. Sin embargo se ha propuesto que el *Se* sustituye al *S* en reacciones químicas importantes y estructuras, como los enlaces disulfuro, alterando la función normal y la integridad celular. La sustitución de *S* por *Se* en la queratina podría resultar en las anomalías observadas en pelo y pezuñas. Otro posible mecanismo es

la disminución de tiol, requerido por diversas enzimas para el metabolismo normal, debido a la reacción entre selenito y glutatión. Finalmente, radicales libres (como los aniones superóxido) pueden producirse por las reacciones de ciertas formas de *Se* con tioles tisulares, causando daños oxidativos en los tejidos (NRC, 2005).

Se ha encontrado que una dosis entre 9 y 20 mg *Se* por kg de peso puede ser letal para becerros, mientras que la dosis letal (LD₅₀) sugerida para ovinos es de 10 a 15 mg *Se* por kg de peso (NRC, 2005). En cabras, una dosis de 40 mg de *Se* por kg de peso provocó la muerte de la mitad de los animales entre las primeras 8 h después de la administración, mientras que la otra mitad murió entre las 27 y 96 h (Ahmed *et al.*, 1990).

La concentración máxima tolerable es de 5 ppm *Se* en la dieta de rumiantes, sin embargo se sugieren dietas con valores más bajos para evitar acumulación excesiva del mineral en tejidos comestibles (NRC, 2005; NRC, 2007). En corderos complementados por un año hasta con 10 ppm *Se* en la dieta, a partir de selenito de sodio, no mostraron signos clínicos de toxicidad ni lesiones tisulares; sin embargo animales en pastoreo pueden acumular más *Se* orgánico por más tiempo por lo que 10 ppm podría representar riesgo de toxicidad por periodos de tiempo más prolongados (Cristaldi *et al.*, 2005). Así mismo, ovejas complementadas hasta con 20 ppm *Se* en la dieta durante 72 semanas no presentaron signos clínicos de toxicidad ni daños histopatológicos, sin embargo algunas ovejas consumiendo 16 y 20 ppm *Se* presentaron un poco de crecimiento anormal en pezuñas y caída de lana, por lo que con estos consumos de *Se* los animales pudieron estar ya sufriendo toxicosis (Davis *et al.*, 2006).

Hay algunos factores o situaciones que predisponen a los animales a sufrir toxicidad por *Se* (NRC, 2005):

- **Especie.** Los ovinos pueden ser más resistentes a toxicidad por *Se* que los bovinos y caballos.
- **Edad.** Los animales jóvenes son menos tolerantes al *Se* que los adultos.
- **Vitamina E.** Los animales deficientes en vitamina E son más susceptibles a intoxicación por *Se* que los no deficientes.
- **Forma química.** El *Se* elemental es mucho menos tóxico que selenito y selenato.

- **Dieta.** El *Se* es más tóxico que con dietas semipurificadas. También dietas con alto contenido de proteína o aminoácidos azufrados pueden ayudar a reducir los efectos de la toxicidad por *Se*.
- **Sulfatos.** Elevado consumo de sulfatos o azufre incrementan la excreción urinaria de *Se* reduciendo los efectos de toxicidad.
- **Otros microelementos.** Antimonio, arsénico, bismuto, cadmio, cobre, germanio, mercurio, plata y tungsteno pueden atenuar la toxicidad por *Se*.

2.7 Requerimiento de *Se* en ovinos

El NRC (2007) ha propuesto la estimación del requerimiento de *Se* para ovinos a través del método factorial. Se considera una excreción de *Se* endógeno de 0.25 µg por kg de peso como base de cálculo del requerimiento de mantenimiento. Para crecimiento y producción de lana se considera 0.5 mg *Se* por kg de ganancia de peso y 0.38 mg por kg de lana limpia, respectivamente. Para gestación se ha estimado 0.010 mg de *Se* acumulado por día, mientras que para producción de leche se considera un promedio de 0.14 mg de *Se* por kg de leche producida. Las fórmulas para calcular tales requerimientos se presentan en el Cuadro 1.4. En todos los casos se considera un coeficiente de absorción en función del tipo de dieta consumida por el animal (0.31 para forrajes y 0.60 para dietas concentradas).

Cuadro 4
Ecuaciones para el cálculo del requerimiento de *Se* en ovinos basado en el método factorial (NRC, 2007).

Requerimiento	Ecuación ¹
Mantenimiento	0.00025 mg/kg PV/CA
Crecimiento	0.50 mg/kg GDP/CA
Gestación (último tercio)	0.0025 mg/kg PCN/CA
Producción de leche	0.14 mg/kg Leche/CA
Producción de lana	0.38 mg/kg LL/CA

1/ PV=peso vivo; GDP=ganancia diaria de peso; PCN=peso de la camada al nacimiento; LL=lana limpia; CA=coeficiente de absorción del *Se* (0.31 para dietas a base de forraje y 0.60 para dietas con alto contenido de grano).

Anteriormente la concentración de *Se* en la dieta recomendada para ovinos era de 0.1 a 0.2 ppm sin hacer distinción de edad, estado fisiológico y potencial productivo de los animales

(NRC, 1985). El método factorial propuesto por el NRC (2007) permite solventar este problema.

De acuerdo a las regulaciones de la FDA el *Se* complementario puede adicionarse en dietas de ovinos a partir de selenito o selenato de sodio, o levadura enriquecida con *Se* sin exceder una concentración de 0.3 ppm en raciones mixtas o un consumo diario por animal de 0.7 mg en complementos alimenticios o premezclas minerales. Sin embargo, el requerimiento de *Se* en ovinos en crecimiento puede ser superior dependiendo del peso del animal o del contenido de grano en la dieta (Figura 2; NRC, 2007).

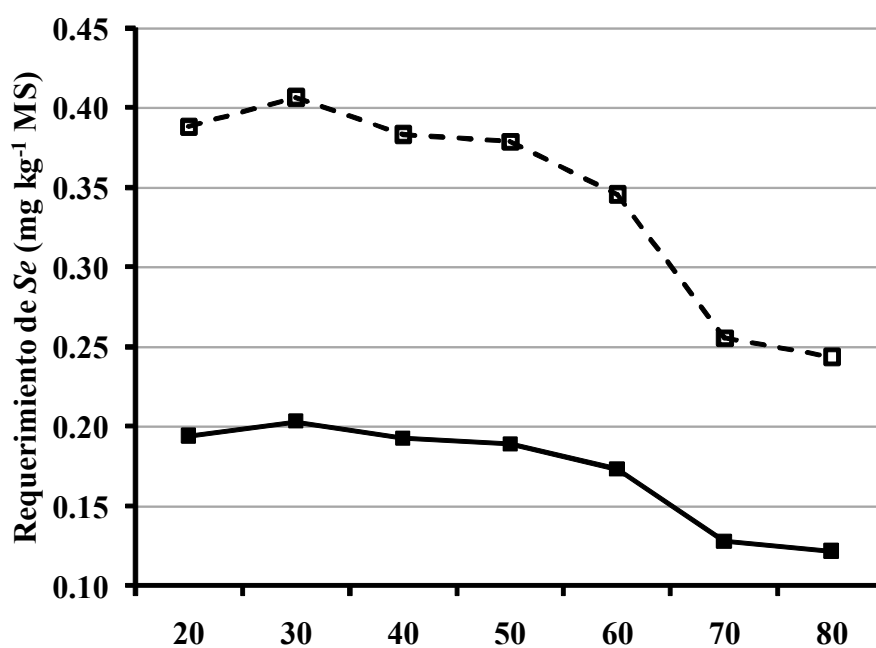


Figura 2
Requerimiento de *Se* para ovinos en función del peso vivo consumiendo una dieta a base de forraje (◆) o concentrado (■) y con una ganancia diaria de peso de 300 g (NRC, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar los cambios en variables de fermentación ruminal, digestibilidad de nutrientes y balance de *Se* en corderos suplementados con selenito de sodio (200, 500 y 800 μg de *Se* por kg de *MS*) en dietas con 69 y 50% de grano de maíz.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar los cambios en población microbiana y productos de la fermentación ruminal por efecto de la suplementación con selenito de sodio en corderos.
- Evaluar la digestibilidad o desaparición de nutrientes a través del tubo digestivo en corderos suplementados con selenito de sodio, a partir del flujo y excreción de nutrientes.
- Calcular la retención de *Se* en corderos suplementados con selenito de sodio a través de su balance.
- Concluir sobre la mejor concentración de *Se* en la dieta para corderos en función de los resultados obtenidos en fermentación ruminal y digestibilidad de nutrientes.

4. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El *Se* inorgánico es metabolizado por bacterias ruminales incorporando una parte en masa bacteriana y reduciendo otra a compuestos de *Se* de baja biodisponibilidad para el rumiante. También la adición de *Se* inorgánico en cantidades inferiores a la concentración máxima tolerable en dietas para rumiantes puede alterar la producción de *AGV* y la digestión de nutrientes. Se ha propuesto que el *Se* inorgánico es usado por bacterias anaerobias como aceptor final de electrones durante la respiración. Por tanto, la hipótesis en este estudio es:

La adición de 200, 500 y 800 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$ en dietas para corderos usando selenito de sodio provoca cambios en la población de microorganismos ruminales o en su metabolismo alterando la concentración de productos de la fermentación y la digestibilidad de nutrientes, lo cual puede cambiar el requerimiento de *Se* para corderos en crecimiento.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Localización

El experimento se realizó en el área metabólica del Postgrado de Ganadería, en el Colegio de Postgraduados¹, donde las muestras también fueron procesadas y analizadas (laboratorios de Nutrición Animal y Microbiología), a excepción de *Se* total que fue determinado en la División de Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1², perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2 Animales

Ocho corderos machos (Suffolk X Dorset; 43.2 ± 4.7 kg de peso) fueron alojados en jaulas metabólicas individuales y elevadas. Se les colocó una cánula de taigon tipo T en rumen (2.5 cm diámetro) y duodeno (1 cm diámetro) mediante cirugía usando anestesia general (ROMPUN[®], hidrocloreuro de Xilazina al 2%, 0.1 mL por cada 10 kg de peso) y local (SERVACAINA[®], Lidocaína al 2%, aproximadamente 10 mL en el área de la cirugía ruminal; KETAMINA[®], clorhidrato de ketamina, 1 mL por animal vía intravenosa para la incisión en duodeno). Después de la cirugía se aplicó un antibiótico (BENZA-BIOTIC LA[®], penicilina y dihidroestreptomicina, 3 mL diarios por cada 50 kg de peso por 5 d), un analgésico y antiinflamatorio (FLUNEXIM[®], Meglumina de flunixin, 1 mL por animal por cada 50 kg de peso) y cicatrizantes (TOPAZONE[®] aerosol y NEGASUNT[®] polvo, aplicación tópica). Durante su recuperación los corderos se alimentaron a libre acceso con heno de avena y alfalfa. También se les aplicó subcutáneamente 1 mL de IVERMECTINA[®] por cada 50 kg de peso y 1 mL intramuscular de VIGANTOL[®] ADE FUERTE por cordero.

5.3 Dietas y alimentación

Se formularon dos dietas (Cuadro 5): una con 69% de grano de maíz (*Grano69*) y otra con 50% (*Grano50*), las cuales en promedio tuvieron 220 ± 28.5 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$. Las dietas se formularon para cubrir los requerimientos nutricionales de los corderos (NRC, 1985; NRC, 2007). Se usó óxido de cromo como marcador de fase sólida para calcular el flujo y

¹ Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

² Km. 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, C.P. 54700, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

digestibilidad de nutrientes. Se preparó una mezcla mineral para manipular adecuadamente los tratamientos mediante un buen mezclado del selenito de sodio. Los corderos fueron alimentados diariamente a las 07:00 y 19:00 h, restringiendo el consumo al 2.5% (*Grano 69*) y 1.9% (*Grano 50*) del peso vivo, para que consumieran todo el alimento ofrecido. Los comederos estuvieron ubicados en la parte frontal de la jaula y los bebederos a un costado, ambos en la parte exterior.

5.4 Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental consistió de dos cuadros latinos repetidos con arreglo factorial de tratamientos. La primera etapa se realizó como un cuadro latino incompleto 3 X 4 repetido (tres periodos experimentales como hileras y ocho animales como columnas [4 por repetición]) usando la dieta *Grano69*. La segunda etapa se realizó como un cuadro latino 4 X 4 repetido (cuatro periodos experimentales y ocho animales) usando la dieta *Grano50*. Por tanto hubo anidamiento de periodos dentro de dieta y de animales dentro de repetición.

Se evaluaron cuatro cantidades de *Se* suplementario (factor A) y dos porcentajes de grano de maíz en la dieta (factor B), por lo que se aplicaron 8 tratamientos:

- Tratamiento 1 = Dieta con 69% de grano de maíz sin *Se* suplementario.
- Tratamiento 2 = Dieta con 69% de grano de maíz con 200 μg de *Se* kg^{-1} MS
- Tratamiento 3 = Dieta con 69% de grano de maíz con 500 μg de *Se* kg^{-1} MS
- Tratamiento 4 = Dieta con 69% de grano de maíz con 800 μg de *Se* kg^{-1} MS
- Tratamiento 5 = Dieta con 50% de grano de maíz sin *Se* suplementario
- Tratamiento 6 = Dieta con 50% de grano de maíz con 200 μg de *Se* kg^{-1} MS
- Tratamiento 7 = Dieta con 50% de grano de maíz con 500 μg de *Se* kg^{-1} MS
- Tratamiento 8 = Dieta con 50% de grano de maíz con 800 μg de *Se* kg^{-1} MS

Las cantidades de *Se* utilizadas son inferiores a la concentración máxima tolerable para ruminantes por lo que no hubo riesgo de causar toxicidad en los corderos (Cristaldi *et al.*, 2005; NRC, 2005; Davis *et al.*, 2006).

5.5 Recolección y almacenamiento de muestras

Alimento. Se obtuvieron aproximadamente 500 g de cada dieta y 50 g de mezcla mineral en cada periodo. Estas muestras fueron molidas (criba 1 mm diámetro) y almacenadas en frascos (aproximadamente 200 mL) para ser analizadas en laboratorio.

Cuadro 5
Ingredientes y composición nutrimental de las dietas experimentales.

Concepto	<i>Grano69</i> (1ª etapa)	<i>Grano50</i> (2ª etapa)
Ingredientes, % en base seca		
Rastrojo de maíz	20.00	39.00
Grano de maíz quebrado	69.00	50.00
Pasta de soya	2.00	1.00
Gluten de maíz	5.30	7.00
Urea	0.90	1.00
Óxido de cromo	0.40	0.40
Mezcla mineral ¹	2.40	1.60
Nutrientes		
Materia seca, % ²	91.41	92.32
Materia orgánica, % ²	95.56	93.69
ENm, Mcal/kg ³	1.89	1.67
ENg, Mcal/kg ³	1.26	1.06
Proteína cruda, % ²	14.31	15.56
FDN, % ²	31.94	50.59
Ca, % ³	0.80	0.71
P, % ³	0.36	0.35
Se, µg kg ⁻¹ MS ²	242	204

1/ Se preparó con piedra caliza (80.85%), fosfato de sodio (12.77%) y cloruro de sodio (6.38%) para *Grano69*; o con carbonato de calcio (62.49%), ortofosfato de calcio (28.13%) y cloruro de sodio (9.38%) para *Grano50*. Se adicionaron 18.2, 45.7 y 73.1 (*Grano69*) o 27.4, 68.5 y 109.6 (*Grano50*) mg de selenito de sodio por kg de mezcla mineral para obtener 200, 500 y 800 µg Se kg⁻¹ MS en la dieta.

2/ Valores determinados en laboratorio.

3/ Valores calculados a partir de tablas.

Fluido duodenal, materia fecal y orina. Se obtuvieron dos muestras diarias de fluido duodenal (200 mL, mediante cánula duodenal), materia fecal (50 g, por estimulación rectal) y orina (50 mL, con botellas de plástico de 500 mL ubicadas bajo el prepucio y sujetadas al cordero) durante los últimos cuatro días de cada periodo. La recolección fue en los siguientes horarios: día 1, 08:00 y 14:00 h; día 2, 09:30 y 15:30 h; día 3, 11:00 y 17:00 h; y día 4, 12:30 y 18:30 h. Por tanto se obtuvieron ocho muestras de cada cordero, las cuales se conjuntaron en una sola muestra representativa del intervalo de tiempo transcurrido entre las dos comidas del día. Las muestras duodenales y fecales fueron congeladas (-20 °C), deshidratadas, molidas (criba 1 mm diámetro) y almacenadas en frascos de vidrio (200 mL). Las muestras de orina también fueron congeladas a -20 °C.

Líquido ruminal. Se obtuvo una muestra (100 mL) de líquido ruminal en el último día de cada periodo, 3 a 4 h después de la primera alimentación, a través de la cánula ruminal usando una bomba de vacío. La muestra fue filtrada a través de cuatro capas de manta de cielo y luego se midió el pH (potenciómetro portátil ORION RESEARCH modelo SA 210). Se mezclaron 3 mL de la muestra con 3 mL de una solución de formaldehído³ y la mezcla se refrigeró a 3 °C para realizar conteo de bacterias y protozoos. Otros 20 mL del filtrado fueron mezclados con 5 mL de ácido metafosfórico (25% p/v) y congelados para determinar la concentración de *AGV* y nitrógeno amoniacal. Finalmente, se congeló una muestra (20 mL) de líquido ruminal filtrado para determinar la concentración de *Se* total.

5.6 Procesamiento de muestras y análisis de laboratorio

Líquido ruminal y orina

Conteo de bacterias ruminales. Se hizo una dilución 1/200 de la muestra de líquido ruminal con formaldehído⁴. El conteo se hizo con una cámara Petroff-Hausser IMPROVER BIRGH-LINE (0.020 mm profundidad), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se realizaron 10 conteos, cada uno en un área de 0.0025 mm², usando un microscopio MICROLUZ MX-TFOFLC (lente ocular PG 10x) con el lente objetivo 100x.

³ Para 100 mL: 5 mL Sol. Min. I y II, 50 mL formaldehído (18%) y 40 mL agua destilada.

⁴ Como agente de dilución se preparo la siguiente solución mineral: 90 mL de agua destilada más 5 mL de solución mineral I (6 gramos de K₂HPO₄ por L de solución) y 5 mL de solución mineral II (6 gramos de K₂HPO₄, 6 gramos de (NH₄)₂SO₄, 12 gramos de NaCl, 2.45 gramos de MgSO₄ y 1.6 gramos de CaCl 2H₂O, en un L de solución).

Conteo de protozoos ruminales. Se hizo una dilución 1/4 del líquido ruminal con formaldehído. El conteo se realizó con una cámara Neubauer IMPROVER BIRGH-LINE (0.100 mm profundidad), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se realizaron 15 conteos con el lente objetivo 40x, cada uno en un área de 1 mm².

Concentración de *AGV* y nitrógeno amoniacal (*NA*). Se centrifugó 1 mL de la muestra de líquido ruminal con ácido metafosfórico a 11 mil *rpm* (9469 x g) por 15 min⁵. El sobrenadante fue usado para determinar la concentración de *AGV* por cromatografía de gases⁶ (Zinn, 1988) y de *NA* mediante espectrofotometría de luz visible (630 nm; AOAC, 2003)⁷.

Concentración de *Se*. Se centrifugó líquido ruminal a 3,000 *rpm* (1,207 x g) para precipitar partículas de alimento y protozoos⁸. Se mezcló 1 g de líquido ruminal u orina con 5 mL de agua desionizada, 5 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de peróxido de hidrógeno al 30% en vasos de teflón con tapa hermética. Después de reposar 30 min se digirieron las muestras en un horno de microondas (MARS 5 CEM Corporation) con las etapas: 1) rampa para alcanzar 120 °C (5 min); 2) mantenimiento de temperatura (2 min); 3) rampa para alcanzar 170 °C (5 min); 4) mantenimiento de temperatura con de 350 psi de presión (5 min); y 5) enfriamiento (5 min). Las muestras se colocaron en una campana extractora durante 1 h y luego fueron transferidas a matraces volumétricos (25 mL) y aforadas con HCl 7M. Las muestras se almacenaron a 4 °C en frascos con tapa (aproximadamente 100 mL) para ser leídas al siguiente día por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros⁹. Se realizó el mismo proceso para las muestras de orina (Ghany-Hefnawy *et al.*, 2007).

Alimento, quimo duodenal y heces

Materia seca y cenizas. Se determinó materia seca (*MS*) eliminando la humedad de las muestras a 70 °C por 12 h, y el contenido de cenizas incinerando las muestras a 600 °C por 12 h (AOAC, 2003).

⁵ Centrífuga DUPONT SORVALL modelo MC12V, viales de 1.5 mL, rotor de 7 cm de radio.

⁶ Cromatógrafo PERKIN ELMER Modelo CLARUS 500.

⁷ Espectrofotómetro UV-visible Marca VARIAN, Modelo CARY 1E.

⁸ Centrífuga EPENDORF Modelo 5804, rotor de 12 cm de radio.

⁹ Espectrofotómetro VARIAN modelo SPECTRA AA-800.

Nitrógeno total. Se determinó por Micro-Kjeldahl digiriendo las muestras con ácido sulfúrico concentrado, destilando en ácido bórico al 4% y titulando con ácido clorhídrico 0.1 N (AOAC, 2003).

Purinas. Se digirieron las muestras de quimo duodenal con ácido perclórico al 60% calentando a 100 °C por 1 h. Se usó nitrato 0.4 M de plata para precipitar purinas y la lectura se realizó por espectrofotometría (260 nm; Zinn and Owens, 1986).

Nitrógeno amoniacal. Se determinó en quimo duodenal por espectrofotometría como en líquido ruminal (AOAC, 2003), pero el nitrógeno amoniacal fue previamente solubilizado con ácido clorhídrico al 50% por 1 h.

Almidón. Las muestras se solubilizaron enzimáticamente con una solución amortiguadora de acetato de sodio y Termozyme a 100 °C. Luego se incubaron con Glucozyme a 50 °C por 16 h y la lectura se hizo mediante espectrofotometría (505 nm; Herrera-Saldaña *et al.*, 1990).

Fibra detergente neutro. Se hirvieron las muestras con una solución de lauril sulfato de sodio por 1 h, se filtraron con papel WATMAN[®] y se secaron a 70 °C (Weizhong and Udén, 1998).

Cromo. Las muestras se incineraron a 600 °C por 12 h y las cenizas fueron solubilizadas con 4 mL de bromato de potasio al 4.5% y 3 mL de una solución de ácido fosfórico y sulfato de manganeso¹⁰. La lectura se hizo por espectrometría de absorción atómica¹¹ (Koenig et al., 1997).

Selenio (Se). El análisis fue similar al usado para determinar *Se* en líquido ruminal y orina, pero para la digestión se mezcló 0.1 g de muestra con 2 mL de agua desionizada, 5 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Las etapas de digestión fueron: 1) rampa para alcanzar 200 °C (10 min); 2) mantenimiento de temperatura con 200 psi de presión (10 min); y 3) enfriamiento (5 min). Las muestras se filtraron¹² para eliminar residuos (*Cr* o partículas no solubilizadas), transferidas a matraces volumétricos y aforadas.

¹⁰ 970 mL de ácido fosfórico concentrado más 30 mL de una solución de sulfato de Mn (7.58g de sulfato de Mn aforando a 100 mL).

¹¹ Espectrómetro de absorción atómica Marca VARIAN, Modelo SPECTRA 10 PLUS.

¹² Papel WATMAN 40, 70 mm de diámetro.

5.7 Variables de respuesta

Las variables de respuesta del ambiente ruminal fueron: pH, concentración de *Se* ($\mu\text{g L}^{-1}$), concentración de bacterias (1×10^{10} cels. mL^{-1}), concentración de protozoos (1×10^5 cels. mL^{-1}), concentración de *NA* (mg dL^{-1}), concentración (mMol L^{-1}) y proporción molar (%) de *AGV* y producción de metano (moles metano producido por mol de glucosa fermentada; Wolin, 1960). Los cálculos se presentan en el Anexo B1.

Las variables de respuesta digestivas fueron: 1) flujo a duodeno y excreción fecal de *MS*, *MO*, almidón, *FDN*, *N* y *Se*; 2) digestibilidad ruminal, post-ruminal y total de *MS*, *MO*, almidón y *FDN*, así como desaparición ruminal, post-ruminal y total de *N* y *Se*; 3) eficiencia de utilización del *N* consumido y eficiencia de pasaje del *N* microbiano; y 4) balance de *Se*. La digestibilidad o desaparición ruminal, post-ruminal y total, así como la eficiencia del *N* se calcularon como lo hicieron Ramírez *et al.* (1998) (anexos B2 y B3).

5.8 Transformación de datos

Se realizó la prueba de normalidad a los datos con el procedimiento UNIVARIATE de SAS (SAS, 2000), por lo que se transformaron aquellos que no cumplieron con este supuesto. Se aplicó el logaritmo natural a los datos de: 1) flujo a duodeno de almidón; 2) excreción fecal de *MO*, almidón, *FDN* y *N*; 3) pH ruminal; y 4) concentración de *Se*, protozoos, ácido propiónico y ácido butírico en líquido ruminal. La raíz cuadrada fue usada para transformar los datos de concentración de bacterias ruminales y excreción fecal de *Se*. El análisis de varianza se realizó sobre los datos transformados, pero los resultados se presentan en la escala original.

5.9 Análisis estadístico

El análisis de varianza fue realizado con el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 2000), usando el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijklm} = \mu + Se_i + G_j + SeG_{ij} + R_k + P_{l(j)} + A_{m(k)} + e_{ijklm}$$

Donde:

y_{ijklm} = Variable de respuesta.

μ = Media general.

Se_i = Efecto fijo de la i -ésima cantidad de Se suplementario (Factor A; $i = 1, 2, 3, 4$).

G_j = Efecto fijo del j -ésimo porcentaje de grano en la dieta (Factor B; $j = 1, 2$).

SeG_{ij} = Efecto fijo de la interacción de la i -ésima cantidad de Se suplementario con el j -ésimo porcentaje de grano en la dieta.

R_k = Efecto aleatorio asociado a la k -ésima repetición de cuadro.

$P_{l(j)}$ = Efecto aleatorio asociado al l -ésimo periodo (hileras) anidado en el j -ésimo porcentaje de grano en la dieta.

$A_{m(k)}$ = Efecto aleatorio asociado al m -ésimo animal (columnas) anidado en la k -ésima repetición de cuadro.

e_{ijklm} = Error experimental.

El enunciado RANDOM se usó para especificar los efectos aleatorios y la opción SUB para especificar los sujetos (animales) dentro del modelo. Con la opción DDFM=SATTERTH en el modelo se obtuvieron los grados de libertad correctos para cada estimador y cada prueba. El enunciado LSMEANS se usó para obtener las medias de mínimos cuadrados y sus errores estándar, y PDIF para obtener las diferencias entre medias. Se calcularon estimadores para obtener la tendencia lineal o cuadrática de las medias usando el enunciado ESTIMATE (Littell *et al.*, 1996). Adicionalmente se realizó: 1) un análisis de regresión simple (PROC REG) para obtener los coeficientes de regresión lineal que relacionaron la concentración de Se en líquido ruminal (variable dependiente) con el consumo de Se (variable independiente); y 2) un análisis de correlación (PROC CORR) entre variables del ambiente ruminal.

6. RESULTADOS

6.1 Ambiente ruminal

6.1.1 Concentración de *Se* en líquido ruminal

El porcentaje de grano en la dieta no cambió la concentración de *Se* en líquido ruminal ($P = 0.05$). Sin embargo, dicha concentración incrementó linealmente por efecto del *Se* suplementario ($P \leq 0.01$), aunque no hubo diferencia entre los valores obtenidos con 500 y 800 μg de *Se* ($P = 0.05$). En promedio, se obtuvieron 6.3 ± 1.2 , 8.7 ± 1.1 , 12.4 ± 1.1 y $14.6 \pm 1.1 \mu\text{g Se L}^{-1}$ con la adición de 0, 200, 500 y 800 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$. La ecuación de regresión obtenida que relaciona el consumo de *Se* (X) con la concentración de *Se* en líquido ruminal (Y) fué $Y = 4.62 + 0.01X$; ($P < 0.01$; $R^2 = 0.37$; Figura 3).

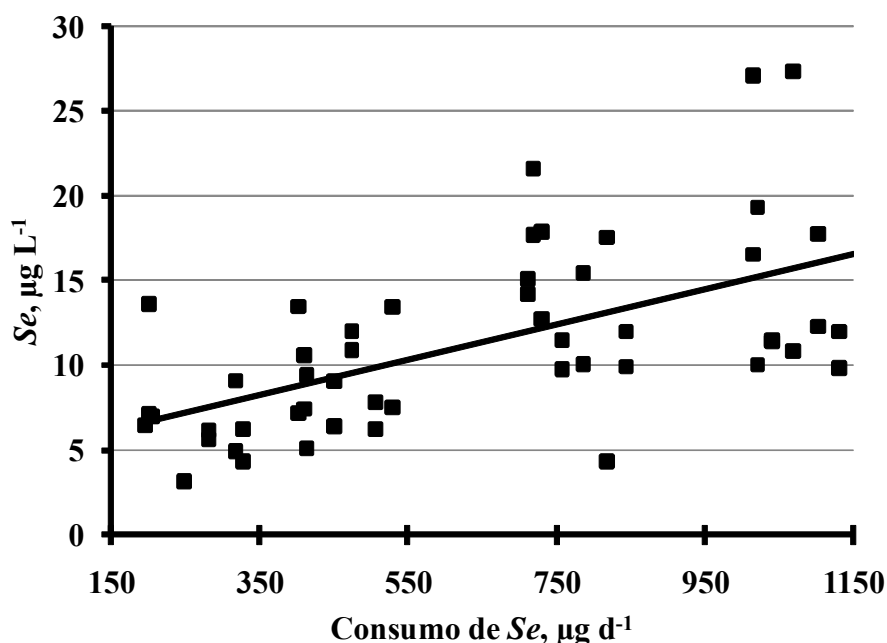


Figura 3

Incremento lineal de la concentración de *Se* en líquido ruminal en corderos suplementados con selenito de sodio.

6.1.2 Población microbiana y productos de la fermentación

El *Se* suplementario no provocó cambios sobre la concentración de bacterias y protozoos ruminales ($P = 0.05$); pero hubo mayor cantidad de protozoos con 69% de grano que con 50% ($P \leq 0.01$). El *Se* suplementario tampoco cambió el pH en líquido ruminal ni la concentración

o proporción molar de *AGV*; tampoco provocó cambios sobre la concentración de *N* amoniacal y la producción teórica de metano ($P = 0.05$). Se observó menor pH en corderos consumiendo 69% de grano que en aquellos consumiendo 50% ($P \leq 0.01$). El grano de la dieta también cambió la concentración de los ácidos propiónico y butírico, la relación acético:propiónico, la proporción molar de *AGV* y la producción de metano ($P \leq 0.01$; Cuadro 6).

Cuadro 6

Medias de mínimos cuadrados y error estándar (EE) para las características del ambiente ruminal en corderos alimentados con 69 y 50% de grano en la dieta.

Variable	69%		50%	
	Media ¹	EE	Media	EE
Protozoos, 1×10^5 cels mL ⁻¹	8.0 **	1.0	5.2	0.9
Bacterias, 1×10^{10} cels mL ⁻¹	2.2	0.2	2.3	0.1
pH	5.55 **	0.05	6.14	0.04
Ácidos grasos volátiles				
Acético, mL ⁻¹	45.4	2.7	46.3	2.6
Propiónico, mL ⁻¹	19.7 **	1.1	13.6	0.9
Butírico, mL ⁻¹	14.8 **	1.0	10.5	0.9
Acético:Propiónico	2.3 **	0.1	3.4	0.1
Acético, mM 100 mM ⁻¹	55.5 **	0.6	65.2	0.5
Propiónico, mM 100 mM ⁻¹	25.1 **	0.9	19.7	0.7
Butírico, mM 100 mM ⁻¹	19.4 **	0.9	15.2	0.8
<i>N</i> amoniacal, mg dL ⁻¹	19.4	1.8	22.6	1.6
Metano ²	0.52 **	0.01	0.61	0.01

1/ ** diferencia significativa entre dietas ($P \leq 0.01$).

2/ moles de metano producidos por mol de glucosa fermentada en rumen.

6.2 Flujo y digestibilidad de nutrientes

6.2.1 Materia seca y materia orgánica

No hubo efecto de *Se* sobre el flujo duodenal de *MS* y *MO* ($P = 0.05$) pero sí sobre su excreción fecal ($P \leq 0.01$), observándose una disminución con 800 μg de *Se* suplementario (efecto cuadrático $P \leq 0.01$; Figuras 4A y 5A). También se encontró interacción *Se***G* en la digestibilidad post-ruminal de *MS* y *MO* ($P \leq 0.05$; Figuras 4B y 5B), incrementando

linealmente ($P \leq 0.01$) con 50% de grano, mientras que con 69% no hubo cambios significativos ($P > 0.05$).

Se observó mayor excreción fecal de *MS* y *MO* ($P \leq 0.01$) en corderos alimentados con 50% de grano (213.0 ± 11.6 y 177.1 ± 9.7 g d⁻¹) que con 69% (143.9 ± 12.9 y 120.1 ± 10.8 g d⁻¹). La digestibilidad ruminal de estos nutrientes fue mayor ($P \leq 0.01$) con 69% de grano (49.6 ± 2.4 y $55.7 \pm 2.1\%$) que con 50% (37.6 ± 2.0 y $45.9 \pm 1.8\%$), al igual que la digestibilidad total (86.5 ± 1.4 y 88.2 ± 1.2 vs. 75.9 ± 1.2 y 78.7 ± 1.1).

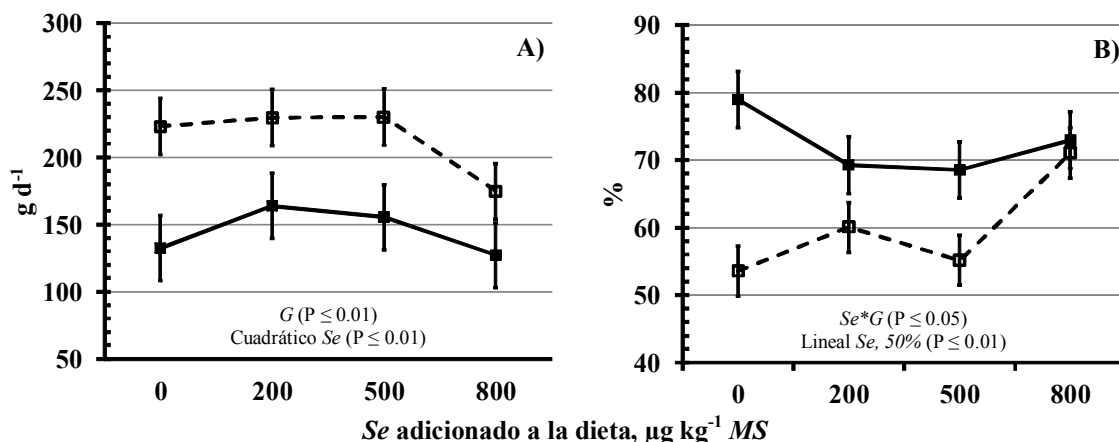


Figura 4

Excreción fecal (A) y digestibilidad post-ruminal (B) de materia seca en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

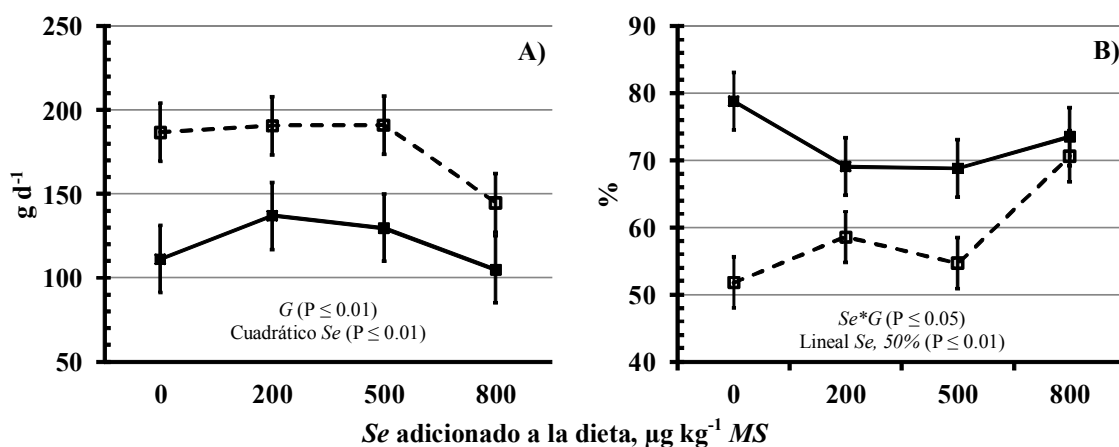


Figura 5

Excreción fecal (A) y digestibilidad post-ruminal (B) de materia orgánica en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

6.2.2 Almidón

La interacción $Se*G$ fue significativa para el flujo duodenal de almidón ($P \leq 0.05$; Figura 6A), disminuyendo linealmente ($P \leq 0.01$) con la adición de Se a la dieta con 69% de grano, mientras que con 50% no ocurrieron cambios significativos ($P > 0.05$). También hubo efecto cuadrático de Se sobre la excreción fecal de almidón ($P \leq 0.01$), encontrándose diferencias entre corderos suplementados con 800 μg y aquellos suplementados con 200 y 500 μg ($P \leq 0.05$).

La excreción fecal de almidón fue mayor ($P \leq 0.01$) en corderos alimentados con 50% de grano que en aquellos consumiendo 69% de grano en la dieta (21.7 ± 1.2 vs. 15.8 ± 1.4 g d^{-1}); sin embargo, el porcentaje de digestibilidad ruminal, post-ruminal y total fue mayor ($P \leq 0.01$) con 69% de grano que con 50% (81.3 ± 1.4 vs. 76.1 ± 1.3 ; 84.2 ± 1.6 vs. 72.7 ± 1.4 ; y 97.2 ± 0.4 vs. 93.7 ± 0.4).

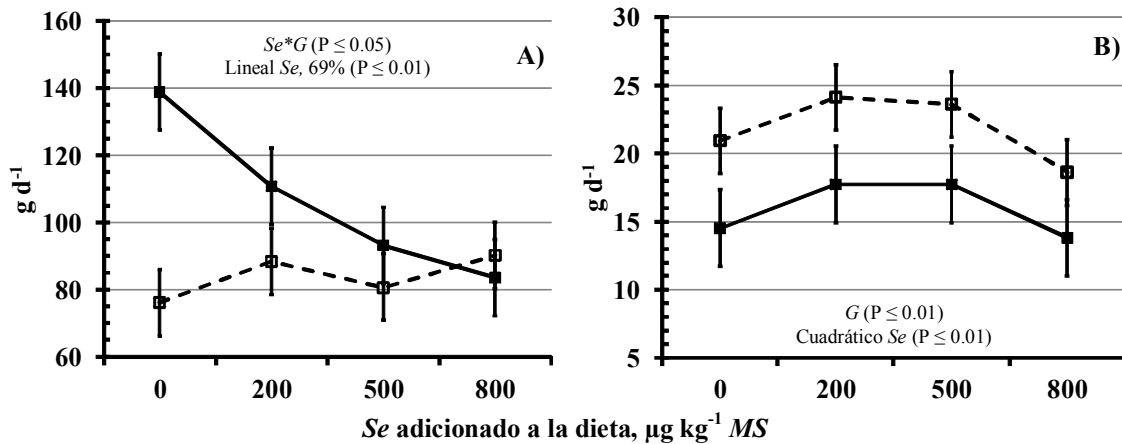


Figura 6

Flujo duodenal (A) y excreción fecal (B) de almidón en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

6.2.3 Fibra Detergente Neutro

Se observó interacción $Se*G$ para el flujo duodenal y la digestibilidad ruminal y post-ruminal de FDN ($P \leq 0.05$; Figura 7). Con 69% de grano el flujo duodenal disminuyó ($P \leq 0.05$) al adicionar 200 y 500 μg de Se ; mientras que con 50% de grano el flujo fue mayor con 800 μg de Se ($P \leq 0.05$). La digestibilidad ruminal con 69% de grano mostró un incremento cuadrático ($P \leq 0.05$) siendo significativamente mayor con 200, 500 y 800 μg de Se respecto a los corderos no suplementados ($P \leq 0.05$); mientras que con 50% de grano la digestibilidad

ruminal disminuyó con 800 μg ($P \leq 0.05$). La digestibilidad post-ruminal con 69% de grano disminuyó al adicionar 500 μg de *Se* ($P \leq 0.05$); pero incrementó linealmente ($P \leq 0.01$) alcanzando un valor máximo con 800 μg de *Se*.

Hubo efecto de grano sobre la excreción fecal y digestibilidad total de *FDN* ($P \leq 0.01$), observándose mayor excreción fecal con 50% de grano que con 69% (69.9 ± 5.1 vs. 38.1 ± 5.6 g d^{-1}); mientras que el porcentaje de digestibilidad total fue mayor en corderos consumiendo 69% de grano en la dieta que en aquellos alimentados con 50% (88.8 ± 1.2 vs. 84.2 ± 1.1).

6.2.4 Nitrógeno

Se encontró efecto cuadrático ($P \leq 0.01$) de *Se* sobre la excreción fecal y digestibilidad total de *N*. La excreción fecal fue menor y la digestibilidad total fue mayor en corderos suplementados con 800 μg de *Se* respecto a lo observado con 200 y 500 μg ($P \leq 0.01$); sin embargo, no fue diferente de lo encontrado en corderos sin *Se* adicional. Hubo interacción *Se*G* para la desaparición post-ruminal del *N* no amoniacal ($P \leq 0.05$). Con 69% de grano la desaparición post-ruminal disminuyó cuadráticamente ($P \leq 0.01$) y se observaron valores más bajos con 200 y 500 μg que sin *Se* suplementario ($P \leq 0.05$); mientras que con 50% de grano incrementó linealmente ($P \leq 0.01$), siendo mayor con 800 μg respecto a los otros tres niveles de *Se* ($P \leq 0.05$).

El flujo duodenal de *N* microbiano fue mayor ($P \leq 0.05$) con 69% de grano en la dieta que con 50% (14.2 ± 0.9 vs. 12.1 ± 0.8 g d^{-1}); mientras que la excreción fecal de *N* fue mayor ($P \leq 0.01$) con 50% de grano que con 69% (3.7 ± 0.3 vs. 4.5 ± 0.3 g d^{-1}). El porcentaje de desaparición total de *N* fue mayor ($P \leq 0.01$) con 69% de grano que con 50% (84.8 ± 1.2 vs. 79.9 ± 1.1); pero la eficiencia en la síntesis de proteína microbiana fue mayor ($P \leq 0.05$) con 50% de grano que con 69% (26.1 ± 3.5 vs. 35.6 ± 3.1).

6.3 Desaparición y balance de Se

El flujo duodenal y la excreción fecal de *Se* incrementaron cuadráticamente ($P \leq 0.01$) con la cantidad de *Se* suplementario. El mayor flujo de *Se* se observó con 800 μg mientras que la mayor excreción fecal se obtuvo con 500 μg (Figura 9A y 9B). También se observó efecto de grano sobre la excreción fecal, siendo mayor con 50% que con 69% ($P \leq 0.01$). La cantidad de *Se* excretado en orina incrementó cuadráticamente ($P \leq 0.01$) con 69% de grano y linealmente

($P \leq 0.01$) con 50% ($Se*G$; $P \leq 0.01$). En corderos suplementados con 800 μg de Se la excreción urinaria fue mayor cuando consumieron la dieta con 69% que con aquella conteniendo 50% ($P \leq 0.01$; Figura 9C).

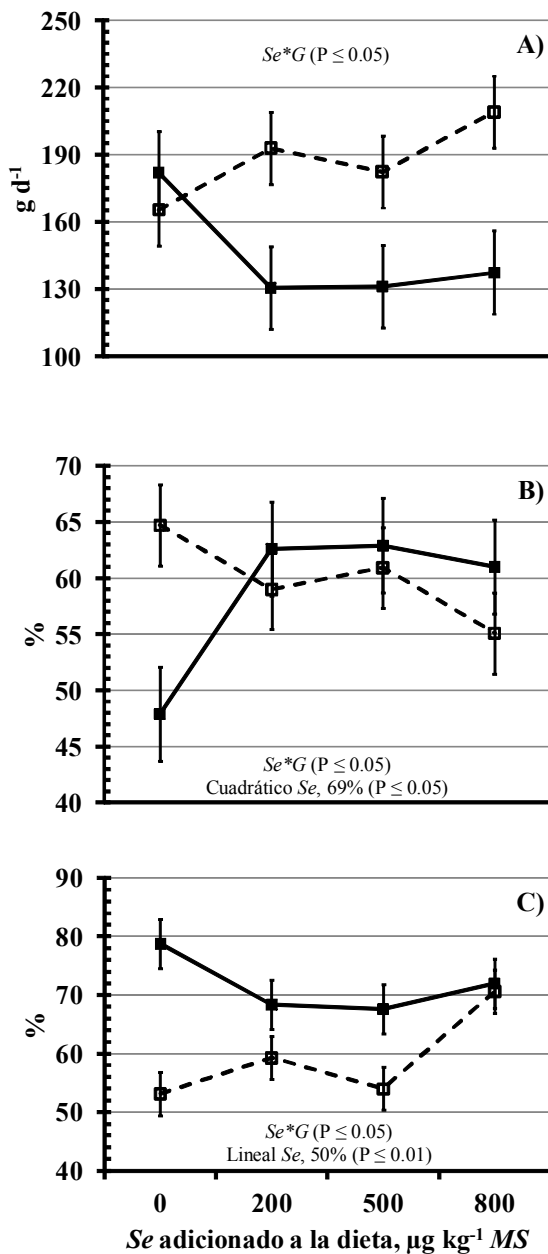


Figura 7
Flujo duodenal (A) y digestibilidad ruminal (B) y post-ruminal (C) de FDN en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

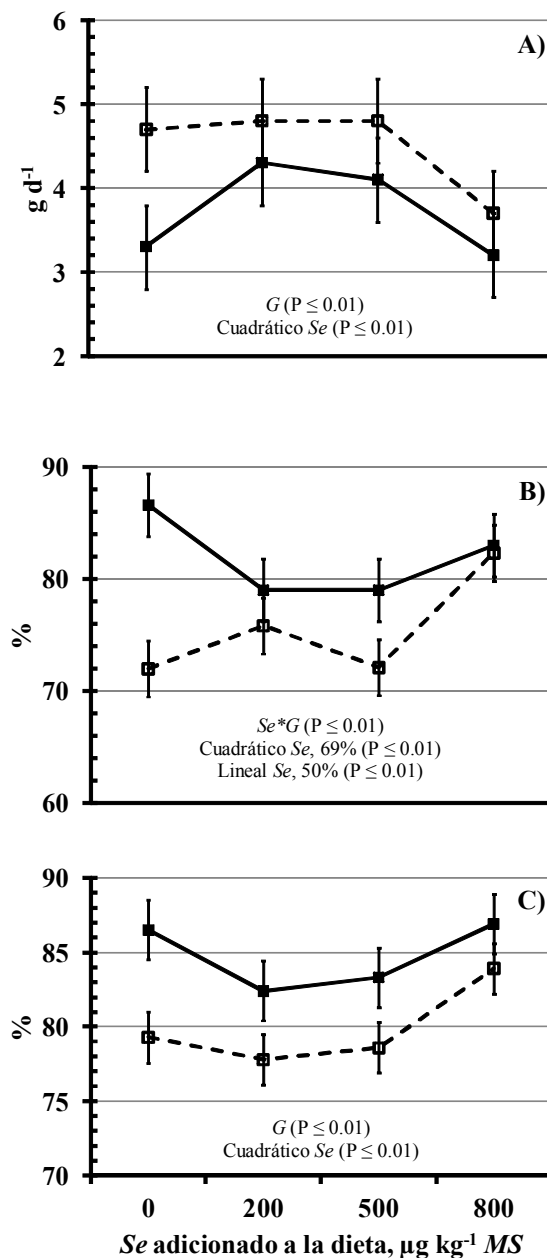


Figura 8
Excreción fecal (A) y desaparición post-ruminal (B) y total (C) de nitrógeno en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

El % de *Se* excretado en heces, respecto al consumido, disminuyó cuadráticamente ($P \leq 0.05$), encontrándose el valor más bajo en corderos consumiendo 800 μg de *Se* suplementario (Figura 11A). La excreción fecal también fue diferente por efecto de grano ($P \leq 0.01$), siendo mayor con 50% de grano que con 69% ($P \leq 0.01$). Hubo interacción *Se***G* ($P \leq 0.05$; Figura 11B) para el % de *Se* excretado en orina, el cual cambió cuadráticamente ($P \leq 0.05$) con 69% de grano mientras que con 50% no tuvo cambios significativos ($P > 0.05$). El % de excreción urinaria fue mayor con 69% de grano que con 50% cuando se adicionaron 0 y 800 μg de *Se* ($P \leq 0.01$).

La desaparición ruminal de *Se* incrementó cuadráticamente ($P \leq 0.01$) por efecto de la suplementación, independientemente del % de grano en la dieta, hasta alcanzar su máximo valor con 500 μg de *Se* suplementario (Figura 10A). La desaparición post-ruminal también cambió cuadráticamente por efecto del *Se* suplementario ($P \leq 0.01$), disminuyendo hasta 500 μg *Se* e incrementando con 800 μg (Figura 10B). La suplementación con *Se* provocó cambios en la desaparición total del *Se* consumido ($P \leq 0.01$), siendo mayor con 800 μg de *Se* suplementario respecto a los otros tratamientos ($P \leq 0.01$; Figura 10C). La desaparición post-ruminal y total de *Se* fue mayor con 69% de grano que con 50% ($P \leq 0.01$).

Se observó interacción *Se***G* ($P \leq 0.05$) para la cantidad y % de *Se* retenido en los corderos. En ambos casos La cantidad de *Se* retenido disminuyó linealmente ($P \leq 0.01$) con 69% de grano; mientras que con 50% de grano incrementó cuadráticamente ($P \leq 0.01$) observándose mayor retención con 800 μg respecto a los otros niveles de *Se* suplementario ($P \leq 0.05$; Figura 12A). El % de retención con 69% de grano también disminuyó linealmente con la suplementación ($P \leq 0.01$), observándose incluso un valor negativo con 800 μg de *Se* suplementario. Con 50% de grano el % de retención disminuyó cuadráticamente ($P \leq 0.01$), alcanzando el valor más bajo con 200 y 500 μg (Figura 12B).

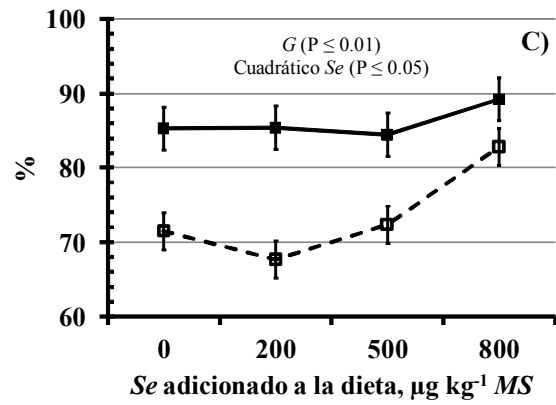
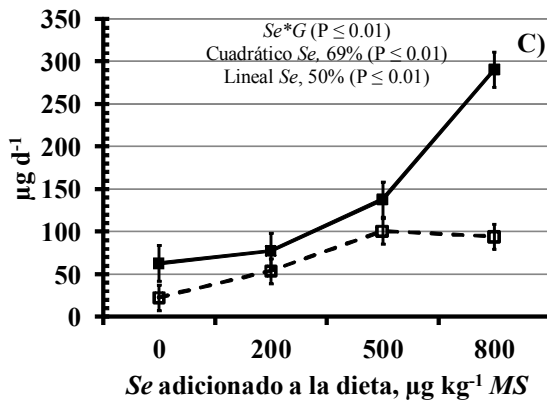
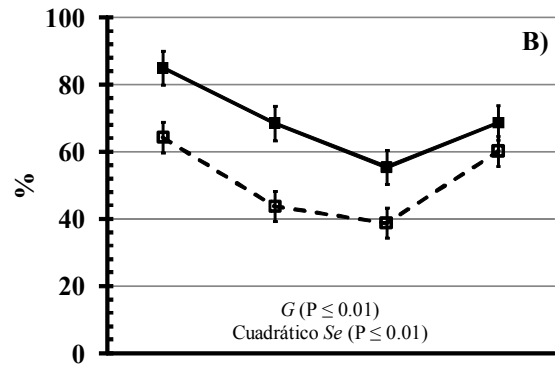
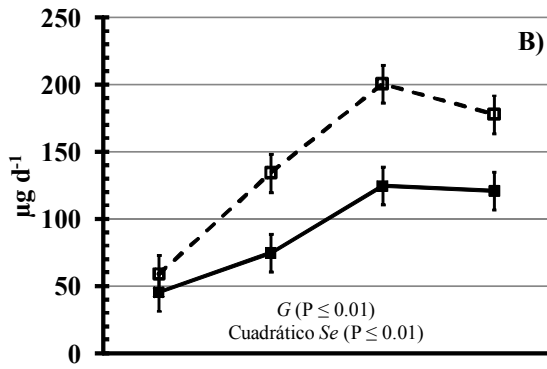
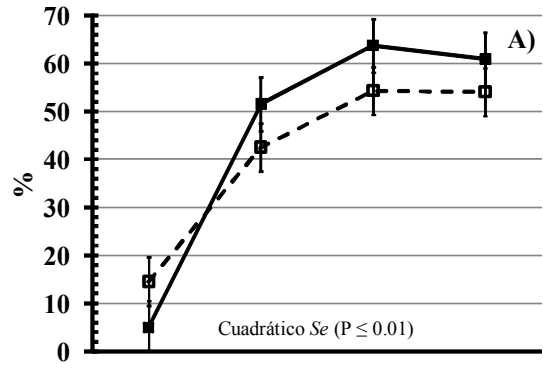
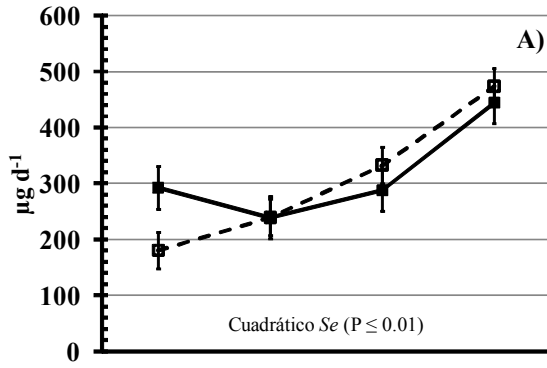


Figura 9

Flujo duodenal (A) y excreción fecal (B) y urinaria (C) de Se en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

Figura 10

Desaparición ruminal (A), post-ruminal (B) y total (C) de Se en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

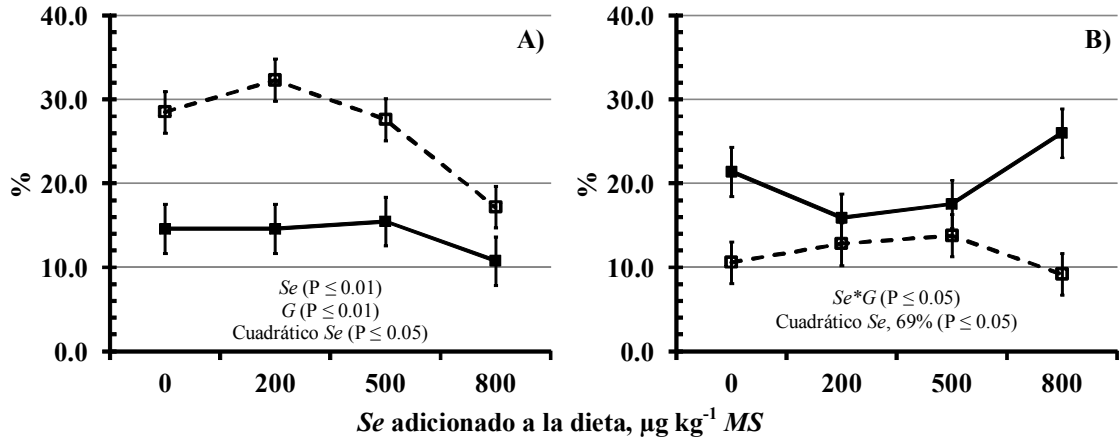


Figura 11
 Porcentaje de excreción fecal (A) y urinaria (B) de *Se* en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

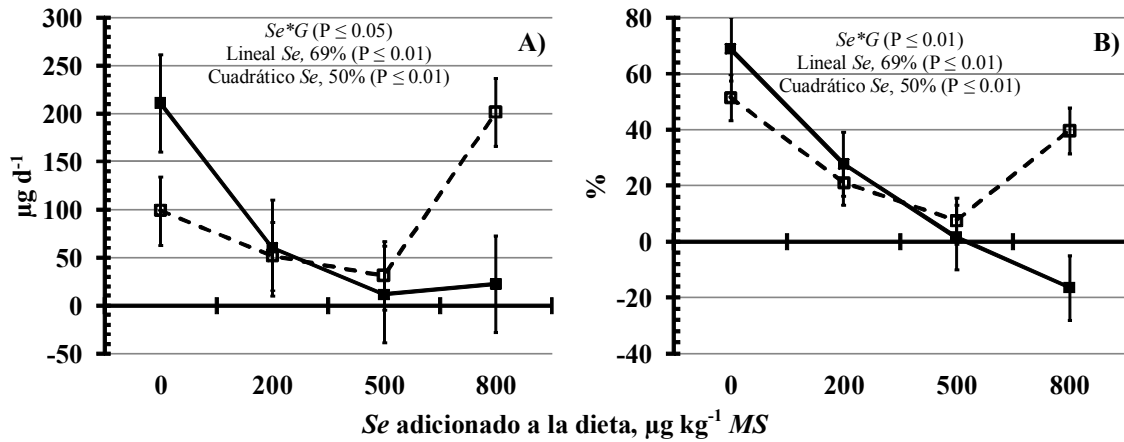


Figura 12
 Retención de *Se* en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69% (—■—) y 50% (---□---) de grano de maíz en la dieta.

7. DISCUSIÓN

7.1. Ambiente ruminal

No se observaron cambios sobre la población microbiana del rumen por efecto del *Se* suplementario, lo cual difiere de lo reportado por algunos autores. Naziroglu *et al.* (1997) observaron mayor concentración de protozoos ruminales al suplementar ovinos con 0.3 ppm de *Se* a través de la dieta. Hidiroglou *et al.* (1968) alimentaron ovinos adultos con una dieta purificada con bajo contenido de *Se* y encontraron que la cantidad de bacterias ruminales era aproximadamente la mitad de la observada con la misma dieta complementada con 1 mg de selenito de sodio (0.45 mg *Se*) o con 1000 U.I. de vitamina E por animal. La falta de concordancia puede deberse a las diferencias en contenido de *Se* de las dietas usadas. En los experimentos de Naziroglu *et al.* (1997) e Hidiroglou *et al.* (1968) se usaron dietas purificadas o con bajo contenido de *Se*, mientras que en el presente estudio las dietas utilizadas tuvieron en promedio 220 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$, valor considerado adecuado en dietas para ovinos (Figura 2; NRC, 2007).

Serra *et al.* (1994b) encontraron correlación entre el contenido de *Se* en líquido ruminal y la producción de masa bacteriana ($R = -0.78$; $P \leq 0.05$). En el presente experimento no se cuantificó la masa bacteriana pero se realizó el conteo directo de bacterias y no se encontró correlación entre concentración de *Se* en líquido ruminal y concentración de bacterias ruminales ($P = 0.05$); por tanto, la diferencia quizá se deba al procedimiento usado en cada caso.

El pH observado con 69% de grano fue ligeramente superior al rango considerado como acidosis crónica (5.0-5.5; Nagaraja y Titgemeyer, 2006), por lo que posiblemente algunos corderos estuvieron en esta condición durante la primer etapa del experimento. Como se esperaba, la dieta con mayor cantidad de grano provocó menor pH ruminal, debido a que el pH disminuye cuando el consumo de carbohidratos de fácil fermentación incrementa (Owens *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos para pH ruminal concuerdan con los resultados de Hernández-Calva *et al.* (2007) quienes alimentaron corderos con 64% de grano de trigo y cebada en la dieta y con 0.1 y 0.3 ppm de *Se* inorgánico, y no observaron cambios significativos sobre esta

variable. Sin embargo, Naziroglu *et al.* (1997) observaron menor pH ruminal en corderos alimentados con 0.3 ppm de *Se* respecto al testigo. También se han reportado cambios en la concentración y proporción molar de *AGV* por efecto de la suplementación con *Se* (Kim *et al.*, 1997; Naziroglu *et al.*, 1997). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron cambios significativos. La falta de concordancia con los resultados reportados en la literatura puede deberse a las diferencias en el tipo de dietas usadas. Posiblemente con dietas a base de grano no haya efecto del *Se* suplementario sobre el pH, lo cual puede estar asociado al tipo de bacterias predominantes. También es posible que dietas purificadas o con bajo contenido de *Se* (Kim *et al.*, 1997; Naziroglu *et al.*, 1997) promuevan cambios en la concentración de productos de la fermentación; sin embargo, en este experimento las dietas usadas no fueron deficientes en *Se*.

La esencialidad del *Se* para las bacterias ruminales no está bien conocida. En mamíferos este elemento es importante ya que es parte estructural de las glutatión peroxidasas, enzimas involucradas en la eliminación de radicales libres (Lei *et al.*, 2007). En bacterias ruminales las enzimas encargadas de eliminar los radicales libres generados en el rumen (O_2^- , superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; y OH^- , radical hidroxilo) son superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa (Hassan y Fridovich, 1978; Fulghum y Worthington, 1984). En bacterias ruminales se ha cuantificado la actividad de glutatión peroxidasa, pero al parecer no es dependiente de *Se* (Lenártová *et al.*, 1998; Holovská *et al.*, 2002).

En otros sistemas diferentes al rumen, se han caracterizado algunas enzimas dependientes de *Se* en forma de selenocisteína (glycina reductasa, formato dehidrogenasas e hidrogenasas) en bacterias anaerobias estrictas (Clostridia) o anaerobias facultativas productoras de metano (*Escherichia coli*) (Axley y Stadtman, 1989). En rumen se ha observado que las bacterias ruminales incorporan *Se* inorgánico en su proteína en forma de selenocistina, selenoetionina, selenohomocisteína y selenometionina, por sustitución del azufre (Hudman and Glenn, 1984 y 1985). Se requiere investigación para saber si alguno de estos selenoaminoácidos es parte estructural de algunas enzimas importantes en el metabolismo de las bacterias ruminales.

7.2. Flujo y digestibilidad de nutrientes

La información referente a la suplementación con *Se* y su efecto sobre el metabolismo digestivo de nutrientes es limitada y poco concluyente. Serra *et al.* (1994) no observaron

cambios significativos sobre la digestibilidad de *MS*, *MO*, *PC*, *FDN* y *FDA* con la adición de 0.2 ppm de *Se* a partir de selenito y selenato de sodio usando una dieta a base de forraje; pero Bravo y Bañuelos (1994) incrementaron la digestibilidad total de la *FDN* en corderos al adicionar 0.2 ppm de *Se* en la dieta.

En este estudio, la suplementación con selenito de sodio provocó cambios sobre la digestibilidad de nutrientes; sin embargo, estos cambios se dieron, en la mayoría de los casos, sobre la digestibilidad (*MS*, *MO* y *FDN*) o desaparición (*N*) post-ruminal en corderos alimentados con 50% de grano. En la porción intestinal también existe una población importante de bacterias anaerobias que degradan y utilizan nutrientes no digeridos en rumen, encontrándose en ciego y colon concentraciones y proporciones molares de *AGV* incluso similares a las del rumen (Stevens y Hume, 1998). Los cambios ocurridos en digestibilidad post-ruminal pueden estar asociados a un efecto sobre la actividad de estos microorganismos.

En rumen, el incremento en digestibilidad de la *FDN* por efecto del *Se* suplementario con 69% de grano provocó menor flujo duodenal de esta, lo cual causó a su vez que se redujera su digestibilidad post-ruminal; mientras que ocurrió lo contrario con 50% de grano (Figura 7). Esto posiblemente refleje diferente efecto del *Se* suplementario sobre las bacterias ruminales predominantes con cada tipo de dieta.

7.3. Desaparición y balance de *Se*

Los resultados obtenidos respecto a la excreción de *Se* concuerdan con los de Serra *et al.* (1994a), quienes suplementaron corderos con 0.2 mg de *Se* kg⁻¹ *MS* usando selenito de sodio, y observaron mayor excreción fecal y urinaria de *Se*. López *et al.* (1969) también observaron que la excreción urinaria de *Se* incrementaba conforme incrementaba el consumo de *Se* en un rango de 0.01 a 5 ppm.

Se ha observado que la mayor excreción de *Se* consumido por rumiantes ocurre a través de las heces y en menor grado en la orina, por lo que las heces son la principal vía de excreción de este elemento a diferencia de lo que ocurre en no rumiantes (Langlands *et al.*, 1986; Serra *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 1997). En el presente estudio las heces fueron la principal vía de excreción de *Se* en corderos alimentados con 50% de grano en la dieta; mientras que la excreción urinaria fue la principal vía con 69% de grano. Koenig *et al.* (1997) observaron en

corderos consumiendo una dieta alta en grano y $843 \mu\text{g Se d}^{-1}$ un mayor porcentaje de *Se* consumido que fue excretado en orina (24%) comparado con el observado con una dieta a base de forraje y con $555 \mu\text{g Se d}^{-1}$ (18%), pero en ningún caso la excreción urinaria superó a la fecal (47 y 57% del *Se* consumido, respectivamente).

Entre el 40 y 65% del *Se* suplementado desapareció en rumen (Figura 10A), pero el principal sitio de absorción de *Se* es el intestino delgado (NRC, 2005); por tanto, es probable que el *Se* desaparecido en rumen no haya sido absorbido en este sitio, sino que haya sido eliminado por volatilización a través del eructo. López *et al.* (1969) reportaron en corderos un alto porcentaje de *Se* administrado oralmente que es eliminado por volatilización (de 20 a 30%). Dimetilselenuro es un compuesto de *Se* muy volátil y algunos microorganismos como bacterias y hongos son capaces de producirlo por metilación de *Se* inorgánico (Fleming y Alexander, 1972; Thompson-Eagle *et al.*, 1989). En rumen la producción de Dimetilselenuro es elevada y la cantidad de *Se* eliminado por esta vía puede ser superior que la eliminada por heces y orina (López *et al.*, 1969). El análisis de los resultados también indica que la adición de selenito de sodio incrementa la cantidad de *Se* volatilizado en rumen, ya que sin *Se* suplementario la desaparición ruminal de *Se* apenas representó entre el 5 y 15% del *Se* consumido.

Las bacterias ruminales son capaces de reducir *Se* inorgánico a *Se* elemental el cual es de muy baja biodisponibilidad para ser absorbido en intestino delgado (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985). El *Se* inorgánico es usado por bacterias anaerobias como aceptor final de electrones durante su respiración (Oremland, *et al.*, 1989; Siddique *et al.*, 2007) y para ser incorporado en selenoaminoácidos (como la selenometionina) tiene que reducirse a selenuro (Sunde, 1997), el cual también es de baja disponibilidad. En el presente estudio la desaparición post-ruminal de *Se* disminuyó con 200 y 500 μg , lo cual refleja la capacidad reductora de las bacterias ruminales disminuyendo la disponibilidad del *Se* para ser absorbido en el intestino. Es posible que al incrementar la cantidad de *Se* a 800 μg la capacidad reductora de las bacterias haya sido saturada, reflejándose en un incremento en la desaparición post-ruminal de *Se* (Figura 10B).

Koenig *et al.* (1997) encontraron mayor digestibilidad de *Se* con dietas a base de grano (63.7%) que con dietas a base de forraje (36.6%). Las recomendaciones del NRC (2007)

indican menor requerimiento de *Se* con dietas a base de grano y mayor con dietas a base de forraje, considerando un coeficiente de absorción del mineral de 0.60 y 0.30, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio si se considera el % de desaparición post-ruminal, el cual en promedio fue 69.3 ± 2.8 y 51.8 ± 2.5 con 69 y 50% de grano en la dieta. Los valores incrementan al considerar el % de desaparición total obtenidos (86.1 ± 1.5 y 73.6 ± 1.4); sin embargo, es conveniente considerar la desaparición post-ruminal ya que considera el *Se* absorbido en intestino y no el *Se* volatilizado en rumen.

El balance de *Se* fue calculado considerando el flujo duodenal de *Se* en lugar del *Se* consumido, para evitar sobreestimar los valores de retención debido a la volatilización de *Se* en rumen. En este estudio disminuyó el *Se* duodenal retenido conforme incrementó la cantidad de *Se* suplementario (Figura 12), lo cual concuerda con lo observado en ovinos y ratas (López *et al.*, 1969; Burk *et al.*, 1972). Sin embargo, al adicionar 800 μg de *Se* la retención observada con 50% de grano incrementó y fue mayor respecto a la observada con 69%. Es posible que el incremento observado en retención con 800 μg de *Se* y con 50% de grano sea debido a la incorporación de *Se* en músculo esquelético, evitándose su eliminación a través de la orina (Figura 9C) ya que la homeostasis del *Se* es regulada por la excreción urinaria más que por la absorción intestinal (Sunde, 1997). La concentración de *Se* en músculo esquelético normalmente es menor respecto a la de otros tejidos (como riñones; Krishnamurti *et al.*, 1997); sin embargo, la cantidad de *Se* total retenida en este tejido puede ser elevada (hasta 10% del *Se* consumido; Lopez *et al.*, 1969). Con 69% de grano y 800 μg de *Se* suplementario se observó un % de retención negativo. Dado que la absorción de *Se* fue mayor con esta dieta es posible que se haya saturado la capacidad de almacenamiento de los tejidos, promoviendo la excreción endógena a través de las secreciones biliares por movilización en los tejidos como mecanismo homeostático (Langlands *et al.*, 1986).

8. CONCLUSIONES

Considerando los objetivos planteados y las condiciones en las que se realizó este experimento, se concluye que:

1. La adición de 200, 500 y 800 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$ en dietas con 69 y 50% de grano de maíz, usando selenito de sodio, no provoca cambios en el pH ruminal y en la concentración de bacterias y protozoarios ruminales; así como en los productos de la fermentación (*AGV*, *N* amoniacal y metano).
2. La suplementación con 200 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$ incrementa la digestibilidad ruminal de la *FDN* en corderos alimentados con 69% de grano de maíz; pero la reduce en corderos consumiendo 50% de grano y 800 μg de *Se* suplementario.
3. La digestibilidad o desaparición post-ruminal de *MS*, *MO*, *FDN* y *N* incrementa con la adición de 800 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$ en corderos alimentados con 50% de grano, pero no cambia significativamente con 69% de grano en la dieta.
4. La desaparición ruminal del *Se* consumido en corderos suplementados con 200, 500 y 800 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$ es elevada (40-65%) respecto a la observada en corderos no suplementados (5-15%), por lo que es factible considerar un alto grado de volatilización ruminal del *Se* suplementado, el cual se pierde a través del eructo.
5. Las heces representan la principal vía de excreción de *Se* en corderos suplementados con selenito de sodio y consumiendo 50% de grano; mientras que la excreción urinaria es más importante cuando se usa una dieta con 69% de grano.
6. El efecto benéfico de la suplementación con selenito de sodio ocurrió en corderos consumiendo una dieta con 50% de grano al mejorar la digestibilidad post-ruminal de nutrientes con 800 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$; por tanto, el requerimiento de *Se* en estas condiciones puede ser mayor al recomendado por el NRC (2007), incluso con un contenido de *Se* adecuado en la dieta (220 $\mu\text{g Se kg}^{-1} \text{MS}$).

9. LITERATURA CITADA

- Ahmed, K.E., S.E.I. Adam, O.F. Idrill and A.A. Wahbi. 1990. Experimental selenium poisoning in Nubian goats. *Vet. Hum. Toxicol.* 32: 249-251.
- Aitken, P. 2001. Selenium toxicity. *In Practice.* 23: 286-289.
- Alfaro, E., M.W. Neathery, W.J. Miller, R.P. Gentry, C.T. Crowe, A.S. Fielding, R.E. Etheridge, D.G. Pugh, and D.M. Blackmon. 1978. Effects of varying the amounts of dietary calcium on selenium metabolism in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 70: 831-836.
- Ammerman, C.B., D.H. Baker and A.J. Lewis. 1995. Bioavailability of nutrients for animals amino acids, minerals and vitamins. Academic Press. New York, USA. 441 p.
- AOAC. 2003. Official methods of analysis, 17th edition. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C.
- Arthur, J.R., R.C. McKenzie and G.J. Beckett. 2003. Selenium in the immune system. *J. Nutr.* 133: 1457S-1459S.
- Axley, M.J. and T.C. Stadtman. 1989. Selenium metabolism and selenium-dependent enzymes in microorganisms. *Annu. Rev. Nutr.* 9: 127-137.
- Baldwin, R.L., and M.J. Allison. 1983. Rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* 57 (Suppl.2): 461-477.
- Bach, A., S. Calsamiglia, and M.D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88(E. Suppl.): E9-E21.
- Beckett, G.J. and J.R. Arthur. 2005. Selenium and endocrine systems. *J. Endocrinol.* 184: 455-465.
- Behne, D. and A. Kyriakopoulos. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 453-473.
- Bravo M., E., y J. Bañuelos L. 1994. Comportamiento de ovinos suplementados con selenio. Tesis Profesional. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 80 p.
- Burk, R.F., D.G. Brown, R.J. Seely, and C.C. Scaief III. 1972. Influence of dietary and injected selenium on whole-body retention, route of excretion, and tissue retention of $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ in the rat. *J. Nutr.* 102: 1049-1056.
- Burk, R.F., K.E. Hill, and A.K. Motley. 2003. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for Selenoprotein P. *J. Nutr.* 133: 1517S-1520S.

- Ceballos M., A., M.F.G. Wittwer. 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. Arch. Med. Vet. 28: 5-16.
- Cristaldi, L.A., L.R. McDowell, C.D. Buergelt, P.A. Davis, N.S. Wilkinson, and F.G. Martin. 2005. Tolerance of inorganic selenium in wether sheep. Small Rum. Res. 56: 205-213.
- Davis, P.A., L.R. McDowell, R. Van Alstyne, T.T. Marshall, C.D. Buergelt, R.N. Weldon, and N.S. Wilkinson. 2002. Effects of form of parenteral or dietary selenium supplementation on body weight and blood, liver, and milk concentrations in beef cows. Professional Animal Scientist. 24: 52-59.
- Davis, P.A., L.R. McDowell, N.S. Wilkinson, C.D. Buergelt, R. Van Alstyne, R.N. Weldon and T.T. Marshall. 2006. Tolerance of inorganic selenium by range-type ewes during gestation and lactation. J. Anim. Sci. 84: 660-668.
- De Aluja, A.S. y P. Adame. 1977. Miopatía degenerativa en becerros. Vet. Mex. 8: 2-12.
- Ehlig, C.F., D.E. Hogue, W.H. Allaway and D.J. Hamm. 1967. Fate of selenium from selenite or seleno-methionine, with or without vitamin E, in lambs. J. Nutr. 92: 121-126.
- Elghany H., A., R. López-Arellano, A. Revilla-Vázquez, E. Ramírez-Bribiesca and J. Tórtora-Pérez. 2008. Effect of pre- and postpartum selenium supplementation in sheep. J. Anim. Vet. Adv. 7: 61-67.
- Fleming, R.W. and M. Alexander. 1972. Dimethylselenide and Dimethyltelluride formation by a strain of *Penicillium*. Appl. Microbiol. 24: 424-429.
- Fordyce, F. 2007. Selenium geochemistry and health. Ambio. 36: 94-97.
- Fulghum, R.S. and J.M. Worthington. 1984. Superoxide dismutase in ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 48: 675-677.
- Ganther, H.E., O.A. Levander and C.A. Baumann. 1966. Dietary control of selenium volatilization in the rat. J. Nutr. 88: 55-60.
- Ghany-Hefnawy, A.E., R. López-Arellano, A. Revilla-Vázquez, E. Ramírez-Bribiesca, and J. Tórtora-Pérez. 2007. The relationship between fetal and maternal selenium concentrations in sheep and goats. Small Rum. Res. 73: 174-180.
- Harrison, J.H. and H.R. Conrad. 1984. Effect of dietary calcium on selenium absorption by the nonlactating dairy cows. J. Dairy Sci. 67: 1860-1864.
- Hassan H.M. and I. Fridovich. 1978. Regulation of the synthesis of Catalase and Peroxidase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 253: 6445-6450.
- Hemingway, R.G. 2003. The influences of dietary intakes and supplementation with selenium and vitamin E on reproduction diseases and reproductive efficiency in cattle and sheep. Vet. Res. Commun. 27: 159-174.

- Henry, P.R., M.G. Echevarria, C.B. Ammerman and P.V. Rao. 1988. Estimation of the relative biological availability of inorganic selenium sources for ruminants using tissue uptake of selenium. *J. Anim. Sci.* 66: 2306-2312.
- Henry, P.R. and C.B. Ammerman. 1995. Selenium bioavailability. In: Ammerman, C.B., D.H. Baker and A.J. Lewis (eds), *Bioavailability of nutrients for animals amino acids, minerals and vitamins*. Academic Press. New York, USA. pp 303-331.
- Herrera-Saldana, R. E., J. T Huber and M. H. Poore. 1990. Dry Matter, Crude Protein, and Starch Degradability of Five Cereal Grains. *J. Dairy. Sci.* 73: 2386-2393.
- Hidiroglou, M., D.P. Heaney, and K.J. Jenkins. 1968. Metabolism of inorganic selenium in rumen bacteria. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 46: 229-232.
- Hidiroglou, M. and Lessard, J.R. 1976. The effect of selenium or vitamin E supplementation on volatile fatty acid content of rumen liquor in sheep fed a purified diet. *Int. J. Nutr. Res.* 46: 458-463.
- Holovská, K., V. Lenártová, K. Holovská, P. Pristaš, and P. Javorský. 2002. Are ruminal bacteria protected against environmental stress by plant antioxidants. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 301-304.
- Hudman, J.F. and A.R. Glenn. 1984. Selenite uptake and incorporation by *Selenomonas ruminantium*. *Arch. Microbiol.* 140: 252-256.
- Hudman, J.F. and A.R. Glenn. 1985. Selenium uptake by *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Bacteroides rumenicola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 27: 215-220.
- Huerta B., M. 1997. Nutrición mineral de rumiantes en pastoreo. En: *Memorias del curso: Alternativas de manejo en bovinos para carne en pastoreo*. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 19-60 pp.
- Ivancic, J. Jr., and W.P. Weiss. 2001. Effect of dietary sulfur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 84: 225-232.
- Kim, J., P.J. Van Soest, and G.F. Combs, Jr. 1997. Studies on the effects of selenium on rumen microbial fermentation *In Vitro*. *Biol. Trace Elem. Res.* 56: 203-213.
- Knowles, S.O., N.D. Grace, K. Wurms, and J. Lee. 1999. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentrations in grazing cows. *J. Dairy Sci.* 82: 429-437.
- Koenig, K.M., L.M. Rode, R.D.H. Cohen, and W.T. Buckley. 1997. Effects of diet and chemical form of selenium metabolism in sheep. *J. Anim. Sci.* 75: 817-827.
- Köhrle, J. 2000. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *CMLS, Cell. Mol. Life. Sci.* 57: 1853-1863.

- Lana, R.P., J.B. Russell, and M.E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76: 2190-2196.
- Langlands, J.P., J.E. Bowles, G.E. Donald and A.J. Smith. 1986. Selenium excretion in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 37: 201-209.
- Lei, X.G., W-H, Cheng, and J.P. McClung. 2007. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 41-61.
- Lenártová, V., K. Holovská, and P. Javorský. 1998. The influence of mercury on the antioxidant enzyme activity of rumen bacteria *Streptococcus bovis* and *Selenomonas ruminantium*. *FEMS, Microbiol. Ecol.* 27: 319-325.
- Lopez, P.L., R.L. Preston and W.H. Pfander. 1969. Whole-body retention, tissue distribution and excretion of selenium-75 after oral and intravenous administration in lambs fed varying selenium intakes. *J. Nutr.* 97: 123-132.
- Littell, R.C., G.A. Milliken, W.W. Stroup, and R.D. Wolfinger. 1996. SAS® system for mixed models. SAS Institute Inc. Cary, NC. 633 p.
- McDowell, L.R., J. Velásquez-Pereira y G. Valle. 1997. Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales. Boletín. 3ª edición. Departamento de Ciencia Animal. Universidad de Florida. Gainesville, Florida. 84 p.
- Nagaraja, T.G. and E.C. Titgemeyer. 2006. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90(E. Suppl.): E17-E38.
- Nahapetian, A.T., M. Janghorbani, V.R. Young. 1983. Urinary trimethylselenonium excretion by the rat: effect of level and source of selenium-75. *J. Nutr.* 113: 401-411.
- Naziroglu, M., Aksakal, M., Cay, S. and Celik, S. 1997. Effects of vitamin E and Selenium on some rumen parameters in lambs. *Acta Vet. Hung.* 45: 447-456.
- NRC. 1983. Selenium in nutrition. Revised edition. National Academy Press. Washington, D.C. 174 p.
- NRC. 1985. Nutrient requirements of sheep. 6th revised edition. National Academy Press. Washington, D.C. 99 p.
- NRC. 2005. Mineral tolerance of animals. Second revised edition. National Academy Press. Washington, D.C. 510 p.
- NRC. 2007. Nutrient Requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. National Academy Press. Washington, DC. 381 p.
- Oremland, R.S., J.T. Hollibaugh, A.S. Maest, T.S. Presser, L.G. Miller, and C.W. Culbertson. 1989. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and

- culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2333-2343.
- Ortman, K. and B. Pehrson. 1999. Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. *J. Anim. Sci.* 77: 3365-3370.
- Paulson, G.D., A. Baumann and A.L. Pope. 1968. Metabolism of ⁷⁵Se-selenite, ⁷⁵Se-selenate, ⁷⁵Se-selenomethionine and ³⁵S-sulfate by rumen microorganisms *In Vitro*. *J. Anim. Sci.* 27: 497-504.
- Podoll, K.L., J.B. Bernard, D.E. Ullrey, S.R. DeBar, P.K. Ku and W.T. Magee. 1992. Dietary selenate versus selenite for cattle, sheep, and horses. *J. Anim. Sci.* 70: 1965-1970.
- Ramírez, J.E., E.G. Alvarez, M. Montaña, Y. Shen, and R.A. Zinn. 1998. Influence of dietary magnesium level on growth-performance and metabolic responses of Holstein steers to laidlomycin propionate. *J. Anim. Sci.* 76: 1753-1759.
- Ramírez-Bribiesca, J.E., J.L. Tórtora, L.M. Hernández, and M. Huerta. 2001. Main causes of mortalities in dairy goat kids from the Mexican Plateau. *Small Rumin. Res.* 41: 77-80.
- Ramírez-Bribiesca, E., E. Hernández-Camacho, L.M. Hernández-Calva y J.L. Tórtora-Pérez. 2004. Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sodio en la mortalidad de corderos y los valores hemáticos de selenio. *Agrociencia.* 38: 43-51.
- Reffett, J.K., J.W. Spears and T.T. Brown, Jr. 1988. Effect of dietary selenium and vitamin E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with Parainfluenza 3 virus. *J. Anim. Sci.* 66: 1520-1528.
- Sánchez, J., P. Montes, A. Jiménez, and S. Andrés. 2007. Prevention of clinical mastitis with barium selenate in dairy goats from a selenium-deficient area. *J. Dairy Sci.* 90: 2350-2354.
- SAS. 2000. SAS/STAT User's guide. Version 8. SAS Institute Inc. Cary, NC. 1464 p.
- Sattar, A., R.H. Mirza and S.M.I. Hussain. 2007. Effect of prepartum treatment of vitamin E-selenium on postpartum reproductive and productive performance of exotic cows and their calves under subtropical conditions. *Pakistan Vet. J.* 27: 105-108.
- Schrauzer, G.N. 2000. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J. Nutr.* 130: 1653-1656.
- Serra, A.B., K. Nakamura, T. Matsui, T. Harumoto and T. Fujihara. 1994a. Inorganic selenium for sheep I. Selenium balance and selenium levels in the different ruminal fluid fractions. *AJAS.* 7: 83-89.
- Serra, A.B., K. Nakamura, T. Matsui, T. Harumoto and T. Fujihara. 1994b. Inorganic selenium for sheep II. Its influence on rumen bacterial yield, volatile fatty acid production and total tract digestion of timothy hay. *AJAS.* 7: 91-96.

- Serra, A.B., S.D. Serra, K. Shintani, and T. Fujihara. 1997. Bioavailability of rumen bacterial selenium in mice using tissue uptake technique. *Biol. Trace Elem. Res.* 58: 255-261.
- Siddique, T., J.M. Arocena, R.W. Thring, and Y. Zhang. 2007. Bacterial reduction of selenium in coal mine tailings pond sediment. *J. Environ. Qual.* 36: 621-627.
- Smith, K.L., J.S. Hogan and W.P. Weiss. 1997. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J. Anim. Sci.* 75: 1659-1665.
- Spears, J.W. 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J. Nutr.* 133: 1506-1509.
- Stadtman, T.C. 1991. Biosynthesis and function of selenocysteine-containing enzymes. *J. Biol. Chem.* 266: 16257-16260.
- Stevens, C.E. and I.D. Hume. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol. Rev.* 78: 393-427.
- Sunde, R.A. 1997. Selenium. En: O'Dell, B.L. and Sunde, R.A (eds.), *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp 493-556.
- Thompson-Eagle, E.T., W.T. Frankenberger, Jr., and U. Karlson. 1989. Volatilization of selenium by *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1406-1413.
- Underwood, E.J. and N. Suttle, 1999. *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd Edition. Animal Health and Welfare. Penicuik, Edinburgh, UK. 624 p.
- van Ryssen, J.B.J., B.J. van der Merwe, and G.E. Schroeder. 1997. *In Sacco* disappearance in the rumen of selenium in feedstuffs. En: Fisher, P.W.F., M.R. L'Abbé, K.A. Cockell, and R.S. Gibson, *Trace elements in man and animals – 9: proceedings of the ninth international symposium on trace elements in man and animals*. NRC Research Press, Ottawa, Canada. pp 306-307.
- Weizhong, C. and Udén, P. 1998. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fiber. *Anim. Feed Technol.* 74: 281-288.
- Whanger, P.D., P.H. Weswig and J.E. Oldfield. 1978. Selenium, sulfur and nitrogen levels in ovine rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 46: 515-519.
- Wolin, M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43: 1452-1459.
- Wright, P.L. and M.C. Bell. 1964. Selenium-75 in the gestating ewe and fetal lamb: effects of dietary α -tocopherol and selenium. *J. Nutr.* 84: 49-56.
- Yeh, J.-Y., Q.-P. Gu, M.A. Beilstein, N.E. Forsberg and P.D. Whanger. 1997. Selenium influences tissue levels of Selenoprotein W in sheep. *J. Nutr.* 127: 394-402.

Zinn, R. A. and Owens, F.N. 1986. A rapid procedure for purine measurements and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 157-166.

Zinn, R.A. 1988. Comparative feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers supplemented with or without monensin. *J. Anim. Sci.* 66:213-227.

10. ANEXOS

Anexo A. Abreviaturas usadas en el texto

<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>AGV</i>	Ácidos grasos volátiles
<i>cels</i>	Células
<i>d</i>	Día(s)
<i>DI</i>	Deyodinasas
<i>EMB</i>	Enfermedad del músculo blanco
<i>FDA</i>	Fibra detergente ácido
<i>FDN</i>	Fibra detergente neutro
<i>GPX</i>	Glutación peroxidasa
<i>Grano50</i>	Dieta con 50% de grano de maíz
<i>Grano69</i>	Dieta con 69% de grano de maíz
<i>Se*G</i>	Interacción entre <i>Se</i> suplementario y % de grano de la dieta
<i>h</i>	Hora (s)
<i>kg</i>	Kilogramo
<i>L</i>	Litro
<i>mg</i>	Miligramos
μg	Microgramos
<i>min</i>	Minutos
<i>mL</i>	Mililitro
<i>mMol</i>	Milimol(es)
<i>MO</i>	Materia orgánica
<i>MS</i>	Materia seca
<i>N</i>	Nitrógeno
<i>NA</i>	Nitrógeno amoniacal
<i>nm</i>	Nanómetros
<i>ppm</i>	Partes por millón
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>rT3</i>	Triyodotironina inversa
<i>Se</i>	Selenio
<i>Se0</i>	Dieta sin <i>Se</i> adicional
<i>Se200</i>	200 μg de <i>Se</i> por kg de MS
<i>Se500</i>	500 μg de <i>Se</i> por kg de MS
<i>Se800</i>	800 μg de <i>Se</i> por kg de MS
<i>Sec</i>	Selenocisteína
<i>T2</i>	Diyodotironina
<i>T3</i>	Triyodotironina
<i>T4</i>	Tiroxina
<i>TR</i>	Tioredoxin reductasa

Anexo B. Cálculos

B1. Variables del ambiente ruminal

La concentración de bacterias (B) se determinó mediante el siguiente cálculo:

$$B = \frac{\left(\frac{nb}{5 \times 10^{-8}}\right) * fd}{10,000,000,000}$$

Donde nb es el número de bacterias en 0.0025 mm^2 , 5×10^{-8} son los mL en $5 \times 10^{-5} \text{ mm}^3$ (0.0025 mm^2 de área por 0.02 mm de profundidad del área de conteo) y fd es el factor de dilución que fue 200.

El cálculo de protozoos ruminales (P) se realizó de la siguiente manera:

$$P = \frac{\left(\frac{np}{1 \times 10^{-4}}\right) * fd}{100,000}$$

Donde np es el número de protozoarios en 1 mm^2 , 1×10^{-4} son los mL en 0.1 mm^3 (1 mm^2 de área por 0.1 mm de profundidad del área de conteo) y fd es el factor de dilución que fue 4.

La producción de metano (CH_4) fue calculado usando el balance de fermentación teórica para la distribución molar de AGV observada, usando las siguientes fórmulas (Wolin, 1960):

$$CH_4 = [A + (2 * B)] - CO_2$$

$$CO_2 = \frac{A}{2} + \frac{P}{4} + \frac{3 * B}{2}$$

$$Glu = \frac{(2 * A) + (3 * P) + (4 * B) + CO_2 + CH_4}{6}$$

Donde A , P y B representan la concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico, CO_2 la producción de bióxido de carbono y Glu los moles de glucosa fermentada.

B2. Flujo, excreción y digestibilidad de nutrientes

El flujo a duodeno de materia seca (*FDMS*) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$FDMS \text{ (g d}^{-1}\text{)} = \left(\frac{Cr_{\text{alimento}}}{Cr_{\text{duodeno}}} \right) * CMS$$

Donde *Cr* es la concentración de cromo en la dieta (*alimento*) o quimo duodenal (*duodeno*), mientras que *CMS* es el consumo diario de materia seca. Usando el *FDMS* se calculó el flujo a duodeno de otros nutrientes:

$$FD_x = FDMS * x_{\text{duodeno}}$$

Donde *FD_x* es el flujo diario a duodeno del nutriente *x* (materia orgánica, *MO*; almidón; fibra detergente neutro, *FDN*; nitrógeno no amoniacal, *NNA*; nitrógeno microbiano, *NM*; nitrógeno del alimento, *NA*; y selenio, *Se*); mientras que *x_{duodeno}* es el contenido del nutriente *x* en quimo duodenal.

También se calculó la excreción fecal diaria de materia seca (*EFMS*):

$$EFMS \text{ (g d}^{-1}\text{)} = \left(\frac{Cr_{\text{Alimento}}}{Cr_{\text{Heces}}} \right) * CMS$$

Donde *Cr* es la concentración de cromo en la dieta (*alimento*) o materia fecal (*heces*); mientras que *CMS* es el consumo diario de materia seca. Luego se calculó la excreción fecal de otros nutrientes:

$$EF_x = EFMS * x_{\text{heces}}$$

Donde *EF_x* es la excreción fecal diaria del nutriente *x* (*MO*, Almidón, *FDN*, *N* y *Se*); mientras que *x_{heces}* es el contenido del nutriente *x* en heces.

La digestión ruminal, post-ruminal y total de nutrientes (o desaparición en el caso de *N* y *Se*) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Ruminal} = \left(\frac{\text{Consumo}_x - \text{Flujo}_x}{\text{Consumo}_x} \right) * 100$$

$$\text{Post-ruminal} = \left(\frac{\text{Flujo}_x - \text{Excreción}_x}{\text{Flujo}_x} \right) * 100$$

$$\text{Total} = \left(\frac{\text{Consumo}_x - \text{Excreción}_x}{\text{Consumo}_x} \right) * 100$$

Donde Consumo_x , Flujo_x y Excreción_x es el consumo, flujo y excreción diarios del nutriente x .

Adicionalmente se calculó la eficiencia del NM y NNA de la siguiente forma:

$$ENM = \frac{FDNM}{MO_{\text{fermentada}}}$$

$$ENNA = \frac{FDNNA}{N_{\text{Consumido}}}$$

Donde $MO_{\text{fermentada}}$ es la diferencia entre MO consumida menos la MO que llega a duodeno (kg); mientras que $N_{\text{consumido}}$ corresponde a los g de N consumido por día.

B3. Balance de Se

La retención de Se se calculó de la siguiente forma:

$$Ret_{Se} = Se_{\text{duodeno}} - Se_{\text{heces}} - Se_{\text{orina}}$$

Donde Se_{duodeno} , Se_{heces} y Se_{orina} representan la cantidad de Se que fluye a duodeno y la cantidad excretada en heces y orina, por día. Para expresar los valores como % del Se que fluye a duodeno solamente se dividieron los resultados entre Se_{duodeno} y se multiplicó por 100.

Anexo C. Cuadros complementarios

Cuadro C1

Medias de mínimos cuadrados y error estándar (EE) para flujo, excreción y digestibilidad de materia seca y materia orgánica en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69 y 50% de grano de maíz en la dieta¹.

Variable	Grano69				Grano50				Se	G	Se*G
	Se0	Se200	Se500	Se800	EE	Se0	Se200	Se500			
<i>Materia Seca</i>											
Consumo, g d ⁻¹	1097.1	1097.1	1097.0	1096.8		923.1	923.1	923.4	923.4		
Flujo duodeno, g d ⁻¹	649.1	520.9	512.9	528.7	50.9	526.4	605.5	539.8	633.8	44.4	
Excreción fecal, g d ⁻¹	132.4	163.8	155.6	127.2	24.2	223.1	229.6	229.9	174.8	21.0	**
Dig. Ruminal, %	40.9	52.7	53.1	51.7	5.2	43.0	34.4	41.6	31.4	4.6	**
Dig. Post-ruminal, %	78.9	69.2	68.5	72.9	4.2	53.5	60.0	55.1	71.0	3.7	** *
Dig. Total, %	87.6	84.8	85.5	88.3	2.6	75.5	73.3	74.1	80.9	2.2	**
<i>Materia orgánica</i>											
Consumo, g d ⁻¹	1049.1	1047.7	1048.0	1048.4		864.7	864.8	865.7	865.0		
Flujo duodeno, g d ⁻¹	548.7	436.9	431.1	441.0	41.8	422.3	485.7	446.4	515.9	36.3	
Excreción fecal, g d ⁻¹	111.4	137.0	129.7	105.0	20.0	186.7	190.6	191.0	144.7	17.4	**
Dig. Ruminal, %	47.7	58.5	58.8	57.8	4.6	51.2	43.8	48.4	40.3	4.0	**
Dig. Post-ruminal, %	78.8	69.1	68.8	73.5	4.3	51.8	58.6	54.7	70.6	3.8	** *
Dig. Total, %	89.1	86.6	87.3	89.8	2.3	78.2	76.3	77.1	83.1	2.0	**

1/ **Abreviaturas:** Se = efecto principal de cantidad de Se en la dieta (0, 200, 500 y 800 µg Se kg⁻¹ MS para Se0, Se200, Se500 y Se800); G = efecto principal de grano en la dieta (69% y 50% para Grano69 y Grano50); Se*G = interacción de efectos principales. **Significancia:** ** = P ≤ 0.01; * = P ≤ 0.05.

Cuadro C2

Medias de mínimos cuadrados y error estándar (EE) para flujo, excreción y digestibilidad de almidón y fibra detergente neutro en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69 y 50% de grano de maíz en la dieta¹.

Variable	Grano69					Grano50					Se	G	Se*G
	Se0	Se200	Se500	Se800	EE	Se0	Se200	Se500	Se800	EE			
<i>Almidón</i>													
Consumo, g d ⁻¹	592.5	592.0	592.2	592.2	592.2	365.7	365.5	365.5	365.5	365.6			
Flujo duodeno, g d ⁻¹	138.9	110.8	93.1	83.5	11.4	76.2	88.4	80.7	90.2	9.9	**	*	
Excreción fecal, g d ⁻¹	14.5	17.7	17.7	13.8	2.8	20.9	24.1	23.6	18.6	2.4	*	**	
Dig. Ruminal, %	75.5	81.1	83.8	84.7	2.7	78.5	74.3	77.0	74.5	2.4	**	**	
Dig. Post-ruminal, %	89.3	84.0	80.7	82.7	2.9	71.3	71.6	69.0	78.9	2.5	**	**	
Dig. Total, %	97.4	96.9	97.0	97.6	0.9	94.1	92.6	93.2	94.8	0.7	**	**	
<i>Fibra Detergente Neutro</i>													
Consumo, g d ⁻¹	350.9	350.6	350.3	349.7		467.8	467.1	466.7	467.0				
Flujo duodeno, g d ⁻¹	182.0	130.6	131.2	137.4	18.5	165.4	192.9	182.3	209.1	16.1	**	*	
Excreción fecal, g d ⁻¹	36.3	40.9	39.6	35.7	9.3	71.4	73.7	78.3	57.8	8.2	**	**	
Dig. Ruminal, %	47.9	62.6	62.9	61.0	4.2	64.7	59.0	60.9	55.1	3.6	*	*	
Dig. Post-ruminal, %	78.7	68.3	67.6	71.9	4.2	53.1	59.3	54.0	70.6	3.7	*	**	
Dig. Total, %	89.5	87.9	88.0	89.6	1.8	84.4	82.8	82.2	87.4	1.6	**	**	

^{1/} **Abreviaturas:** Se = efecto principal de cantidad de Se en la dieta (0, 200, 500 y 800 µg Se kg⁻¹ MS para Se0, Se200, Se500 y Se800); G = efecto principal de grano en la dieta (69% y 50% para Grano69 y Grano50); Se*G = interacción de efectos principales. **Significancia:** ** = P ≤ 0.01; * = P ≤ 0.05.

Cuadro C3

Medias de mínimos cuadrados y error estándar (EE) para flujo, excreción, desaparición y eficiencia ruminal del nitrógeno en corderos suplementados con selenito de sodio y alimentados con 69 y 50% de grano de maíz en la dieta¹.

Variable	Grano69					Grano50					Se	G	Se*G
	Se0	Se200	Se500	Se800	EE	Se0	Se200	Se500	Se800	EE			
Consumo, g d ¹	25.3	25.1	25.1	25.2	23.0	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1			
Flujo duodeno, g d ¹													
<i>N microbiano</i>	16.5	13.6	12.8	14.0	11.1	12.0	11.8	13.4	13.4	1.3		*	
<i>N alimento</i>	9.0	7.3	7.3	7.5	7.5	9.3	6.8	8.7	8.7	0.8			
Excreción fecal, g d ¹	3.3	4.3	4.1	3.2	4.7	4.8	4.8	3.7	0.5	**	**	**	**
Desaparición, %													
<i>Ruminal</i>	64.6	70.9	71.0	70.3	67.4	60.0	70.7	62.2	3.1				
<i>Post-ruminal</i>	86.6	79.0	79.0	83.0	72.0	75.8	72.1	82.3	2.5	*	**	*	*
<i>Total</i>	86.5	82.4	83.3	86.9	79.3	77.8	78.6	83.9	1.7	*	**	*	**
Eficiencia N ²	1.01	0.83	0.81	0.85	0.81	0.92	0.80	0.96	0.07				
Eficiencia bacteriano ³				6.9				6.0					*

1/ **Abreviaturas:** Se = efecto principal de cantidad de Se en la dieta (0, 200, 500 y 800 µg Se kg⁻¹ MS para Se0, Se200, Se500 y Se800); G = efecto principal de grano en la dieta (69% y 50% para Grano69 y Grano50); Se*G = interacción de efectos principales. **Significancia:** ** = P ≤ 0.01; * = P ≤ 0.05.

2/ Flujo a duodeno de N no amoniacal/consumo de N.

3/ g de N bacteriano/kg de materia orgánica fermentada en rumen.

Anexo C. Ejemplo de los programas usados para el análisis estadístico en SAS

```
PROC MIXED DATA=SELENIO;  
TITLE 'CONCENTRACIÓN DE SELENIO EN LÍQUIDO RUMINAL (LRSE)';  
CLASS GRANO REPETICIÓN PERIODO ANIMAL SELENIO;  
MODEL LRSE= SELENIO GRANO SELENIO*GRANO/DDFM=SATTERTH;  
RANDOM REPETICIÓN PERIODO(GRANO) ANIMAL(REPETICIÓN)/TYPE=CS SUB=ANIMAL(REPETICIÓN);  
LSMEANS SELENIO GRANO SELENIO *GRANO/PDIFF;  
ESTIMATE 'EFECTO LINEAL' SELENIO -3 -1 1 3;  
ESTIMATE 'EFECTO CUADRATICO' SELENIO -1 1 1 -1;  
ESTIMATE 'EFECTO LINEAL 69% GRANO' SELENIO -3 -1 1 3 SELENIO *GRANO -3 -1 1 3 0 0 0 0;  
ESTIMATE 'EFECTO LINEAL 50% GRANO' SELENIO -3 -1 1 3 SELENIO *GRANO 0 0 0 0 -3 -1 1 3;  
ESTIMATE 'EFECTO CUADRATICO 69% GRANO' SELENIO -1 1 1 -1 SELENIO *GRANO -1 1 1 -1 0 0 0 0;  
ESTIMATE 'EFECTO CUADRATICO 50% GRANO' SELENIO -1 1 1 -1 SELENIO *GRANO 0 0 0 0 -1 1 1 -1;  
RUN;
```