



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**SUPLEMENTO DE SELENIO EN LA RESPUESTA
FISIOLÓGICA DE CORDEROS**

ARTEMISA GUADALUPE LÓPEZ GUTIÉRREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

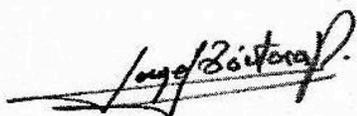
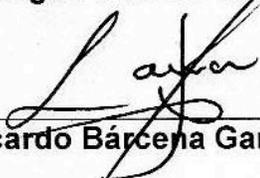
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2009

La presente tesis titulada “**Suplemento de Selenio en la respuesta fisiológica en corderos**”, realizada por la alumna: **Artemisa Guadalupe López Gutiérrez**, bajo la Dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____ Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca
ASESORA	 _____ Dra. Raquel López Arellano
ASESORA	 _____ Dra. Alma Revilla Vázquez
ASESOR	 _____ Dr. Jorge Tórtora Pérez
ASESOR	 _____ Dr. Ricardo Bárcena Gama

ontecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2009

DEDICATORIA

A María Fernanda, la razón más importante en mi vida. Por su eterno cariño y compañía. Gracias por ser el motor de mi vida.

A Limberg, mi esposo, compañero y apoyo fundamental, quien me impulsa siempre a lograr mis metas. Gracias por tu amor, por estos años junto a mí. Te amo.

A mi madre, Bertha, quien siempre está en mi corazón. Gracias por todo lo que me diste, por tu amor, tus enseñanzas. Por ser la razón de iniciar con mis estudios de maestría. Desde dónde estás, se que compartes conmigo este importante logro.

A mi padre, por su apoyo incondicional en todos los momentos importantes de mi vida. Gracias por creer siempre en mí.

A mis hermanas, Moni y Karla con quienes he compartido mi vida y mis sueños. Gracias por su cariño y apoyo en todo momento.

A mis hermanos, Cecilio y Martín, quienes le dieron un significado diferente a nuestras vidas. Gracias por su cariño.

A mis sobrinos, Renata y Erick quienes son parte fundamental en mi vida. Esperando esto los motive siempre a perseguir sus sueños.

A la familia Malvaez Gutiérrez, en especial a mi tía Meche y mi prima Anabel, por su apoyo para lograr finalizar esta meta. Gracias por todo. Las quiero mucho.

A la familia Orobio López, especialmente a mi tía Lupe y mi tío Jorge, por siempre apoyarme en todos mis proyectos. Por su cariño de todos estos años. Gracias.

A Vicky y Héctor, por su valiosa ayuda y apoyo en todo momento. Por estar siempre al pendiente de mi y de cómo apoyarme. Muchas gracias.

A mis amigos: Silvia, Zayda, Lupita, Juan Manuel y Gilberto por su amistad, compañía y apoyo siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme consolidar esta meta, por todas las bendiciones recibidas hoy y siempre.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para concluir mis estudios de maestría.

A Hector Lee y David Chan, por su valiosa ayuda para concluir con este trabajo de tesis. Gracias por el tiempo y esfuerzo invertido en ello.

Al Técnico Andrés Lee, por sus valiosas aportaciones y apoyo para concretar este trabajo.

Al Dr. Efrén Ramírez Bribiesca por su compromiso y apoyo durante mis estudios y para la finalización de esta meta.

A la Dra. Alma Revilla, Dra. Raquel López, Dr. Jorge Tórtora y al Dr. Ricardo Bárcena por su tiempo y dedicación para concluir este trabajo.

A Fabiola Pérez y Oscar del Razo, por su apoyo en la elaboración de los diferentes análisis de laboratorio.

A la Dra. Gladys Hoyos, de Alltech México, por la valiosa oportunidad de trabajar junto a ella y por permitirme el iniciar con mis estudios de maestría.

Los autores expresan el agradecimiento a la Línea Prioritaria de Investigación 7, Inocuidad, Calidad de Alimentos y Bioseguridad, del Colegio de Postgraduados, por el financiamiento de esta investigación.

CONTENIDO

Introducción general.....	1
Capítulo 1. Suplemento de selenio orgánico y variables de respuesta fisiológica en corderos.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
1.1. Introducción.....	8
1.2. Materiales y Métodos.....	11
1.2.1. Animales y manejo.....	11
1.2.2. Dieta experimental.....	11
1.2.3. Variables de estudio.....	12
1.2.3.1. Actividad de glutatión peroxidasa en sangre.....	12
1.2.3.2. Balance de Se.....	12
1.2.3.3. Obtención de muestras de tejidos.....	13
1.2.4. Análisis de laboratorio.....	13
1.2.5. Diseño experimental, modelos y análisis estadísticos.....	13
1.3. Resultados.....	16
1.3.1. Concentración de Se en tejidos.....	16
1.3.2. Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre.....	16
1.3.3. Balance de Se.....	18
1.4. Discusión.....	20
1.4.1. Concentración de Se en tejidos.....	20

1.4.2. Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre.....	20
1.4.3. Balance de Se.....	21
1.5. Conclusiones.....	23
1.6. Literatura citada.....	24
Capítulo 2. Sobredosificación accidental de selenio con bolos intrarruminales de carragenina y selenio inorgánico en corderos	
Resumen.....	28
Abstract.....	29
2.1. Introducción.....	30
2.2. Materiales y Métodos.....	33
2.2.1. Animales y manejo.....	33
2.2.2. Planteamiento experimental y composición de bolos intrarruminales utilizados.....	33
2.2.3. Variables de estudio.....	34
2.2.3.1. Administración de bolos.....	34
2.2.3.2. Signología clínica de toxicidad.....	35
2.2.3.3. Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre.....	35
2.2.4. Análisis de laboratorio.....	35
2.2.5. Diseño experimental, modelos y análisis estadísticos.....	36
2.3. Resultados.....	38
2.3.1. Signología clínica de toxicidad. Descripción de casos.....	38
2.3.2. Concentración de Se en tejidos.....	40
2.3.3. Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre.....	41

2.4. Discusión.....	43
2.4.1. Signología clínica de toxicidad. Descripción de casos.....	43
2.4.2. Concentración de Se en tejidos.....	44
2.4.3. Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre.....	44
2.5. Conclusiones.....	46
2.6. Literatura citada.....	47
Conclusiones generales.....	50
Literatura general citada.....	51
Anexo 1: Procedimiento para la digestión ácida en horno de microondas de muestras de sangre para la determinación de selenio	53
Anexo 2: Procedimiento para la digestión ácida en horno de microondas de muestras de orina para la determinación de selenio	54
Anexo 3: Procedimiento para la digestión ácida en horno de microondas de muestras de tejidos para la determinación de selenio	55
Anexo 4: Procedimiento para la digestión ácida en horno de microondas de muestras de heces para la determinación de selenio	56
Anexo 5: ANEXO 5. Procedimiento para determinar la actividad de Glutatión peroxidasa en sangre (Sarabia, 2004).....	57

LISTA DE CUADROS

1	Composición de la dieta experimental base ofrecida a corderos suplementados con Se orgánico (Selplex™).....	11
2	Concentración de Se ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en los diferentes tejidos de corderos que recibieron Se orgánico (Selplex™) en el alimento durante 35 días.....	16
3	Actividad de GSH-PX en sangre medida en diferentes periodos de tiempo en corderos que recibieron Selplex™ en el alimento durante 35 días.....	17
4	Análisis de varianza de la actividad de GSH-Px en sangre.....	17
5	Balance de Se en corderos alimentados con un suplemento de Se orgánico (Selplex™) en 3 días de muestreo.....	18
6	Análisis de varianza de balance de Se.....	19
7	Composición de la dieta experimental base ofrecida a corderos suplementados con bolos intrarruminales de selenito de sodio y selenato de bario.....	33
8	Composición porcentual de los bolos intrarruminales utilizados.....	34
9	Lesiones en tejidos de corderos suplementados con bolos intrarruminales de selenito de sodio y selenato de bario.....	38
10	Concentración de Se en diferentes tejidos de corderos suplementados con selenito de sodio y selenato de bario con bolos intrarruminales.....	41
11	Actividad de glutatión peroxidasa en sangre medida en diferentes periodos de tiempo en corderos con aplicación de bolos de selenito de sodio y selenato de bario durante 35 días	41

LISTA DE GRÁFICAS

1	Brillantez en vesícula biliar a la necropsia de un cordero intoxicado con selenito de sodio.....	39
2	Interacción de la actividad de GSH-PX en sangre medida en diferentes periodos de tiempo en corderos con aplicación de bolos de selenito de sodio y selenato de bario orgánico (Selplex™) en el alimento durante 35 días	42

INTRODUCCIÓN GENERAL

El selenio (Se) es un nutriente esencial en los animales domésticos, realiza diversas funciones en los sistemas reproductivo, nervioso, muscular, esquelético, hematopoyético e inmune (Anderson *et al.* 1979) también ayuda a la prevención de varias enfermedades y protege la integridad de varios tejidos (Russel 1997). El Se es esencial a nivel fisiológico y al mismo tiempo puede ser tóxico (Scwartz 1957), se han reportado que en regiones deficientes en Se, se afecta la salud, crecimiento y fertilidad del ganado (Underwood 2003). En los alimentos y forrajes la forma más común del Se es unido a metionina (selenometionina), junto con menores cantidades de selenocisteína y selenito. Las diferencias en disponibilidad y metabolismo del Se, se deben a sus diferentes formas estructurales y químicas. En rumiantes la mayor parte del Se ingerido pasa al abomaso junto con el material insoluble, especialmente la fracción bacteriana (Koenig 1997).

El Se es un componente estructural de las selenoproteínas, las cuales son agrupadas en cinco glutatión peroxidasa, tres deiodinasas, tres trioredoxin reductasas, selenofosfato sintetasa, selenoproteína P, selenoproteína W, 15kDa-selenoproteína y 18kDa-selenoproteína (Behne *et al.* 2001; Köhrle 2000). Las funciones de la enzima glutatión peroxidasa son: inactivar radicales libres derivados del oxígeno que se forman en el organismo como consecuencia del metabolismo aerobio; así, ésta enzima es responsable de la protección de la membrana de las células que funcionan en presencia de oxígeno (Miller *et al.* 1993). Las deiodinasas controlan la disponibilidad de T3 y estas participan en el crecimiento, desarrollo, diferenciación y metabolismo de los animales (Köhrle 2000). Existe una selenoproteína en la membrana que puede convertirse de T4 a la forma activa T3, esta es conocida como yodotironina deiodinasa tipo I (IDI); se localiza fundamentalmente en hígado y

riñón pero no se encuentra presente en la tiroides. La T3 se genera principalmente fuera de tiroides (Arthur 1994), existe una segunda dehidrogenasa (tipo 2 o ID2) que también puede generar T3 a partir de T4, pero está sometida a un control de retroalimentación y por ello es sensible a una doble inhibición durante la deficiencia de Se (Underwood 2003). Las funciones de las reductasas son: como antioxidante, como factores del crecimiento celular, inhibidores de apoptosis, reciclaje de ácido ascórbico, en la síntesis de ADN y en la transcripción genética (Mustacich *et al.* 2000). La selenofosfatasa sintetasa es una enzima que se requiere para convertir selenido en selenofosfatasa para donar este Se durante la síntesis de selenocisteína.

Todas las fuentes de Se necesitan ser transformadas en selenido, para su incorporación a selenoproteínas (Behne *et al.* 2001). La selenoproteína P contiene 50% del Se en plasma y probablemente funciona como transportador y antioxidante (Saito *et al.* 2000). La concentración de selenoproteína W es alta en el esqueleto y músculos del corazón en ovinos (Yeh *et al.* 1997). Las concentraciones de selenoproteínas P y W en tejidos están relacionadas con la ingestión de Se (Saito *et al.*, 2000). La enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), contiene 4 átomos de Se por mol de enzima (Pope *et al.*, 1979). Protege a las células de daño oxidativo y cuida la integridad de las membranas en mitocondrias, eritrocitos y células gastrointestinales (Behne *et al.* 2001). La función junto con la vitamina E es como antioxidante, la Vitamina E funciona como un antioxidante liposoluble específico en la membrana y la función del Se es como componente de la GSH-Px que ayudan a destruir peróxidos antes de un ataque a las membranas celulares (Russell 1997). La ingestión de Se afecta la actividad de GPX1 y también la distribución corporal relativa de la enzima (Lei *et al.* 1998). La peroxidasa gastrointestinal GPX2 actúa localmente protegiendo a la mucosa intestinal de los hidroperóxidos de la ración (Chu *et al.* 1993). La peroxidasa extracelular o

plasmática, GPX3 se sintetiza principalmente en hígado y riñón, cuya función es proteger el tubo renal proximal del daño peroxidativo (Underwood 2003). Cuando existe una deficiencia de Se, incrementa el riesgo celular ya que las selenoproteínas más importantes como GXP2 y GXP4 se agotan, de modo que la generación de radicales libres aumenta y se forman hidroperóxidos lipídicos dañinos (Arthur 1998). Los cuatro tipos de peroxidasas conocidas emplean glutatión como un sustrato reductor, la variedad y localización refleja la importancia de controlar la peroxidación, lo cual genera radicales libres y dañan los tejidos. Para finalizar estas reacciones y proteger contra la peroxidación participan otras enzimas como son: súper óxido dismutasas: cobre-zinc y magnesio; catalasas: glutatión-azufre; transferasas y otros protectores no enzimáticos como la vitamina E (MacPherson, 1994).

Durante las fases de desarrollo los tejidos son vulnerables al estrés oxidativo y las consecuencias clínicas por la falta de Se son muy diversas, entre las cuales se encuentran: distrofia muscular, fibrosis pancreática, alteraciones sanguíneas, alteraciones reproductivas, reducción de la resistencia a enfermedades, mortalidad perinatal y retraso del crecimiento. La concentración de Se repercute de manera significativa en la acción de glutatión peroxidasa y la determinación de esta enzima, permite un adecuado diagnóstico del balance de Se en los animales (Maylin *et al.* 1980). Las concentraciones de Se y la actividad de la GPX en tejidos como hígado y músculo, reflejan el aporte de Se y pueden coincidir con las concentraciones en sangre. Se debe considerar que la mayor parte de Se presente en el hígado se encuentra en forma de reserva (Ullrey 1987). Los requerimientos de Se para las diferentes etapas recomendadas por el NRC (2007) son: mantenimiento (0.00025 mg/kg peso vivo/coeficiente de absorción), crecimiento (0.50 mg/kg incremento peso vivo/coeficiente de absorción), gestación (0.0025 mg/kg peso al

nacimiento/coeficiente de absorción), lactación (0.14 mg/kg producción de leche/coeficiente de absorción), crecimiento de fibras (pelo ó lana; 0.38 mg/kg peso de lana limpia/coeficiente de absorción). Como requerimiento mínimo de Se en la dieta, el NRC (1983) indica un intervalo de 0.1 a 0.3 ppm, dependiendo del objetivo de producción.

CAPITULO I

(EXPERIMENTO 1)

**Suplemento de selenio orgánico y variables de respuesta fisiológica
en corderos**

SUPLEMENTO DE SELENIO ORGANICO Y VARIABLES DE RESPUESTA FISIOLÓGICA EN CORDEROS

Artemisa Guadalupe López Gutiérrez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2009.

Se llevó a cabo un ensayo para evaluar el efecto de la concentración de Selenio (Se) en la dieta, así como la adición de Se orgánico, los tratamientos fueron: T1) Dieta testigo, la cual contenía 0.33 mg de Se y T2) Testigo + 300 mg de Selplex, con una concentración final de 0.93 mg de Se. El ensayo se llevo a cabo usando 8 corderos con un peso inicial de 30.5 ± 2.09 Kg, donde la concentración de Se en tejidos, la actividad de glutatión peroxidasa y balance de Se fueron analizados. El Se en la dieta no afecto la concentración se esté en tejidos para el grupo testigo así como para los animales que recibieron Se orgánico. La actividad de glutatión peroxidasa no tuvo diferencias entre tratamientos, aunque presento una tendencia ($p=0.0011$) a disminuir conforme transcurrieron los días del experimento, tanto en el testigo como en el tratamiento con Se orgánico. Los animales que recibieron Se orgánico tuvieron una mayor ($p=0.054$) retención y una mayor ($p \leq 0.05$) absorción con relación al grupo testigo. La adición de Se orgánico mejora el balance en los animales aunque no se refleja en la actividad de glutatión peroxidasa, ni en la concentración en tejidos.

Palabras clave: selenio orgánico, tejidos, glutatión peroxidasa, balance de selenio

ORGANIC SELENIUM SUPPLEMENT AND PHYSIOLOGICAL RESPONSE VARIABLES IN SHEEP

Artemisa Guadalupe López Gutiérrez, MC.
Colegio de Postgraduados, 2009.

It conducted a trial to assess the effect of the concentration of selenium (Se) in the diet and the addition of organic selenium, the treatments were: T1) control diet which contained 0.33 mg of Se and T2) Control + 300 mg of Selplex, with a final concentration of 0.93 mg of Se. The test was carried out using 12 lambs with an initial weight of 30.5 ± 2.09 kg, where the concentration of Se in tissues, glutathione peroxidase activity and balance of Se were analyzed. The Se in the diet did not affect the concentration of Se in tissues for the control group and for animals that received is organic. The glutathione peroxidase activity was not different between treatments, but showed a tendency ($p = 0.0011$) to fall as the days passed the experiment, both in the control and treatment with organic selenium. The animals given organic selenium had a higher ($p = 0.054$) and higher retention ($p \leq 0.05$) relative to uptake control group. The addition of organic selenium improves balance in animals but not reflected in the activity of glutathione peroxidase, or the concentration in tissues.

Key words: organic selenium, tissues, glutathione peroxidase, selenium balance

1.1 INTRODUCCIÓN

La deficiencia de selenio (Se) es un problema endémico desde el altiplano hasta el sur de México, por lo tanto los alimentos que se producen en esta región son pobres en Se, ocasionado concentraciones inadecuadas para mantener las funciones fisiológicas en los animales. Esta deficiencia puede prevenirse de diferentes maneras, el método de elección depende de las condiciones productivas de los animales (McPherson et al. 1984). Las formas de suministrar Se es a través de mezclas minerales, soluciones inyectables de selenito de sodio, soluciones vía oral, bolos intrarruminales, en el agua ó suplemento mineral a libre acceso (Pérez 2007). Las fuentes de Se permitidas para ganado son en forma de selenito de sodio, selenato de sodio, selenato de bario y levaduras con Se (selenometionina) (FDA, 2004). A partir de 2005, la FDA permite la utilización de levadura con Se en la alimentación de ovinos a una concentración no mayor a 0.3 ppm. La literatura comercial menciona un mejor aprovechamiento de Se cuando es suministrado como selenolevadura, debido a que *Sacharomyces cerevisiae* es un microorganismo con alto valor alimenticio, con contenido adecuado de proteínas, lisina, isoleucina, treonina y por supuesto Se en las formas de selenometionina y selenocistina (Urban 2005).

Específicamente, las bacterias ruminales metabolizan la forma inorgánica, incorporándolo a la proteína microbiana como selenometionina; por lo que un aumento en la retención microbiana puede causar competencia con el animal (Kincaid, 1995). Después de que el Se pasa los pre-estómagos, ya sea en forma iónica o incorporada a las bacterias, se absorbe en duodeno y se transporta por plasma para incorporarse a los eritrocitos, leucocitos, mioglobina, nucleoproteínas, miosina y varias enzimas (Harrison et al. 1984). Las diferencias de absorción

entre rumiantes y no rumiantes, se debe a la interacción del mineral ocasionada por los microorganismos del rumen, que cambian una parte en formas insolubles (Se elemental y selenuros) y otra porción la agregan a proteínas para formar algunos selenoaminoácidos como son la selenometionina y selenocistina (Harrison et al. 1984).

La eliminación del Se en rumiantes por heces ocurre en dos etapas: la primera está relacionada con la dosis y la cantidad que existe en el organismo del animal; la segunda es influenciada por la cantidad de Se presente en el animal (Pope et al. 1979). Otra forma de eliminación es en forma de exhalación, excreción urinaria o excreción endógena fecal. Así como en la secreción biliar, en donde aproximadamente un 28% de la producción total corresponde a Se; a pesar de que la mayor parte se reabsorbe, el resto se eliminará en las pérdidas endógenas fecales, las cuáles afectan negativamente el balance de Se (Langlands et al. 1986).

Las diferencias en la disponibilidad de Se, depende de la forma en que se suministra; de tal manera que cuando se proporciona en forma de Se inorgánico, una porción se reduce químicamente a formas insolubles por los microorganismos del rumen, lo que disminuye su absorción. El Se inorgánico solo se incorpora en un aminoácido que es la cisteína dentro de la selenoproteínas con una actividad enzimática específica, mientras que la selenometionina puede ser incorporada directamente dentro de la proteína corporal pero sin actividad (Kincaid, 1995) funcionando como almacén de Se. La forma de suministrar Se orgánico está asociado con levaduras y metionina, que se absorbe fácilmente por la pared intestinal (Weiss, 2003) y entra al "pool" de metionina, incorporándose a las proteínas, pero ahora como un "pool" para Se orgánico (Suzuki et al, 2002). Sin embargo siguen existiendo puntos oscuros en la disponibilidad y la proporción verdaderamente

utilizada. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta fisiológica de corderos suplementados con levaduras.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Animales y manejo.

Se utilizaron 8 corderos machos, criollos, con un peso inicial promedio de 30.5 ± 2.09 kg. Se alojaron en jaulas individuales, equipadas con comedero y bebedero, dentro de la Unidad metabólica ubicada en el Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, Estado de México. Los corderos recibieron una ración diaria de 1.080 kg de alimento base seca al día, proporcionado en dos porciones, a las 7 y 15 horas. El agua se ofreció a libre acceso.

1.2.2 Dieta experimental.

La dieta se calculó de acuerdo a las recomendaciones de NRC (2007), con un contenido de 0.33 ppm de Se, Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de la dieta experimental base ofrecida a corderos suplementados con Se orgánico (Selplex™)

Ingrediente (MS)	%
Maíz quebrado	50.00
Heno de alfalfa	33.00
Pasta de soya	15.00
Mezcla mineral sin Se	2.00
Composición nutrimental calculada (MS)	
Proteína cruda , %	19.07
FDN, %	31.90
FDA, %	15.03
Cenizas, %	6.33
Se, ppm	0.33

El Se orgánico (Selplex™) utilizado contiene una concentración de 2 mg de Se por cada 1000 mg. Los tratamientos fueron: T1) Dieta testigo, la cual contenía 0.33 ppm de Se y T2) Testigo + 300 mg de Selplex, con una concentración final de 0.93 ppm de Se.

1.2.3 Variables de estudio

1.2.3.1 Actividad de Glutación Peroxidasa en sangre

Se tomaron muestras de sangre un día antes de que los corderos recibieran los tratamientos y posteriormente se realizaron 4 muestreos durante todo el experimento. La sangre se colectó en tubos vaccoutainer con anticoagulante, conservándose en hielo y almacenados a -20°C por 4 meses hasta su uso en el laboratorio.

1.2.3.2 Balance de Se.

Durante el experimento se utilizó óxido de cromo en la dieta a una concentración de 0.35% para determinar la producción fecal diaria y el coeficiente de excreción de Se. Las muestras de heces se obtuvieron a las 1:00 y 7:00 hrs post-alimentación y se colectaron diariamente después del día 21. Las muestras de orina se colectaron los días 21, 28 y 35. Todas las muestras se conservaron a -20°C hasta el análisis de laboratorio. El balance de Se se calculó con las concentraciones de Se en el alimento, heces y orina; utilizando las siguientes formulas (Koenig et al., 1997): Absorción (A): $A = I - H$ y retención (R): $R = I - (H + O)$; donde: I= concentración de Se ingerido, H= concentración de Se en heces y O= concentración de Se en orina.

1.2.3.3 Obtención de muestras de tejidos

Los animales se sacrificaron en un rastro particular ubicado en San Martín Texmelucan. Antes del sacrificio se pesaron, se desensibilizaron con una pistola de embolo oculto y se desangraron. Posteriormente se tomaron muestras de músculo, hígado, corazón, pulmón y riñón. Estas se conservaron en congelación a -20 C, hasta su análisis.

1.2.4 Análisis de laboratorio

A todas las muestras o parte de ellas se les determinó: La concentración de cromo por absorción atómica, el contenido de materia seca (MS) y la concentración de Se, utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Varian® SpectraAA 800 a través de la metodología descrita por Baeza (2005). La actividad de la enzima glutatión peroxidasa, se determinó siguiendo la metodología descrita por Sarabia (2004).

1.2.5 Diseño experimental, modelos y análisis estadísticos.

Los corderos se distribuyeron de forma aleatoria en dos tratamientos con cuatro repeticiones cada uno. Para la variable concentración de Se en tejidos se utilizó un diseño completamente al azar con 2 tratamientos y 4 repeticiones cada uno. Los resultados fueron analizados con el procedimiento modelo general lineal (SAS Institute 2000). Las diferencias entre medias de tratamientos se realizaron con la prueba de T-Student.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta correspondiente al i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición

μ = constante que caracteriza a la población

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

$i=1, 2$

E_{ij} = Efecto del error del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición

$j= 1, 2, 3, 4.$

Las variables balance de Se y actividad de glutatión peroxidasa, fueron medidas a través del tiempo y fueron analizadas con el procedimiento Mixed de SAS (SAS Institute 2000). El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + R_j + A_{ij} + P_k + (TP)_{ik} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable de respuesta correspondiente al i-ésimo tratamiento, de la j-ésima repetición, en el k-ésimo período. μ = constante que caracteriza a la población.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

$i=1, 2$

R_j = Efecto de la j-ésima repetición

$j= 1, 2, 3, 4$; A_{ij} = Efecto de la j-ésima repetición en el i-ésimo tratamiento

P_k = efecto del k-ésimo período

TP_{ik} = efecto de la interacción del i -ésimo tratamiento por el k -ésimo periodo

E_{ijk} = error experimental

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Concentración de Se en tejidos.

La concentración de Se en los tejidos solo presentó diferencias en el tejido cardiaco ($P < 0.1$), la desviación estándar fue muy alta. Con respecto a los demás tejidos no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos, Cuadro 2

Cuadro 2. Concentración de Se ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en los diferentes tejidos de corderos que recibieron Se orgánico (Selplex™) en el alimento durante 35 días.

Tratamiento	Corazón	Hígado	Riñón	Musculo	Pulmón
Selplex	258.13	703.51	436.21	331.92	184.32
Testigo	69.43	678.48	687.97	314.50	264.53
EEM	67.06	39.81	78.85	44.57	35.59
Probabilidad	0.09	0.67	0.06	0.79	0.16

EEM. Error estándar de la media

1.3.2 Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre.

No se encontraron diferencias en la actividad de GSH-Px entre los corderos del tratamiento testigo y los del tratamiento con Se orgánico (Selplex™). Sin embargo, en el día 3 del experimento se observó una mayor actividad de esta enzima en los corderos suplementados. Existió una tendencia a disminuir la actividad de GSH-Px conforme transcurrieron los días del experimento, tanto en el testigo como en el tratamiento con Selplex™ (Cuadro 3).

Con respecto al análisis estadístico en el tiempo se encontró una diferencia altamente significativa ($p = 0.0011$), también se presentó una tendencia entre tratamiento y tiempo ($p = 0.08$),

esto deduce que en la respuesta de Se influye el estado fisiológico del animal y pueden presentarse variaciones en la actividad enzimática.

Cuadro 3. Actividad de GSH-PX en sangre medida en diferentes periodos de tiempo en corderos que recibieron Selplex™ en el alimento durante 35 días.

Tiempo (d)	Testigo	Selplex	Valor de P ¹
	nmoles NADPHox/min*ml de sangre		
1	139.58	100.80	0.12
3	49.60 ^b	102.70 ^a	0.03
7	56.10	66.88	0.66
9	60.20	34.50	0.30
13	31.60	75.28	0.08
15	44.18	24.45	0.42
17	53.40	33.55	0.42
19	56.28	49.25	0.77
20	20.65	44.58	0.33
EEM	17.21	17.21	

Cuadro 4. Análisis de varianza de la actividad de GSH-PX en sangre

Efecto	Valor de P
Tratamiento	0.8063
Tiempo	0.0011
Tratamiento*tiempo	0.0816

1= probabilidad encontrada en la prueba de "slices". Medias con distinta literal son diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

1.3.3 Balance de Se.

Los corderos que recibieron Se orgánico (Selplex™) tuvieron una mayor absorción ($p \leq 0.05$) y retención ($p = 0.054$) de Se, en relación a los que se alimentaron con el tratamiento testigo. No se encontró interacción entre el tratamiento y el tiempo para ambos casos (Cuadro 5 y 6).

Cuadro 5. Balance de Se en corderos alimentados con un suplemento de Se orgánico (Selplex™) en 3 días de muestreo

	Testigo			Se orgánico		
	21 d	28 d	35 d	21 d	28 d	35 d
Consumido, mg/día						
Dieta	0.396	0.396	0.396	0.966	0.966	0.966
Excretado, mg/día						
Heces	0.366	0.509	0.164	0.317	0.461	0.267
Orina	0.095	0.192	0.096	0.258	0.275	0.383
Balance, mg/día						
Absorción (A)	0.030	-0.113	0.232	0.649	0.505	0.699
Retención (R)	-0.065	-0.305	0.136	0.391	0.23	0.316
$\bar{X} A \pm EEM$	0.0497^b \pm 0.0892			0.6475^a \pm 0.0892		
$\bar{X} R \pm EEM$	-0.0758^b \pm 0.1239			0.3422^a \pm 0.1239		

Cuadro 6. Análisis de varianza de la balance de Se

Efectos	Absorción	Retención
Tratamiento (T)	0.0032	0.0544
Día (D)	0.0801	0.3262
T x D	0.5017	0.1905

1.4 DISCUSIÓN

1.4.1 Concentración de Se en tejidos.

El riñón es uno de los tejidos que más acumula Se y su respuesta se debe a la deficiencia o al exceso del mineral administrado. Cousin et al. (1961) reportan mayor concentración de Se en riñón, cuando el nivel o la concentración en la dieta es bajo, llegando a concentraciones más altas en el hígado. Por otro lado, los datos reportados por Juniper (2008) comparando a un tratamiento testigo sin suplemento de Se, contra un tratamiento con Se orgánico utilizando una dosis de 0.3 mg kg⁻¹ de alimento, encontró que la concentración total fue mayor en el riñón, seguido por la concentración en hígado, corazón y músculo. Esta respuesta es compatible con lo informado por Tylor (2005) cuando ofreció a corderos dietas con 2.9 mg kg⁻¹ de Se orgánico (Selplex™). Por otro lado, Quin et al (2007) reportan una concentración de Se mayor en el riñón, hígado, músculo y tejidos en ovinos con dietas suplementadas con 0.10 mg kg⁻¹ de Se orgánico (Selplex™).

1.4.2 Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre.

Los resultados encontrados en este experimento coinciden parcialmente con lo encontrado por Van Rayssen (1989) y Gunter (2003) quienes reportan que no encontraron diferencias en la actividad de Glutatión peroxidasa en sangre en ovinos al suplementar Se orgánico (Selplex™) en la dieta. La actividad de glutatión peroxidasa se utiliza como un indicador del estatus de Se en el animal. Sin embargo, conforme el Se en sangre aumenta, la enzima GSH-PX se satura, por lo que en conjunto, tiende a no incrementar la actividad de la enzima (Juniper et al. 2007) y no resulta un buen indicador para diferenciar la suplementación de Se.

1.4.3 Balance de Se.

Se ha reportado un efecto lineal entre la concentración de Se en la dieta y la eliminación, ésta se incrementa conforme aumenta el Se en la dieta. Del mismo modo, hay un efecto lineal con la absorción y con esto, se alcanza un balance más positivo (Ivancic y Weiss 2001). Los corderos que recibieron el tratamiento testigo no presentaron un balance adecuado de Se con un significado biológico. Una de las razones de la falla es asumir, que los animales se encontraban en un estado de equilibrio, que no fue alcanzado (Mendoza et al. 1995). Las diferencias en el balance pueden ser parcialmente atribuidas a la influencia de la actividad microbiana o posiblemente a una mayor retención en tejidos y una menor tasa de pasaje de la digesta a lo largo del tracto gastrointestinal (Patterson et al. 1989). La composición de la dieta influye en la disponibilidad de Se para la absorción en rumiantes, además de que es determinante en el entorno químico y las poblaciones microbianas en el rumen (Koenig et al. 1997). En dietas altas en concentrado, disminuye el pH y se favorece la conversión de Se a formas no disponibles (Ivancic y Weiss 2001).

En el Cuadro 5, se presentan los resultados de los animales que recibieron el tratamiento con Se orgánico (Selplex™), la concentración de Se se incrementó en orina, hay muy poca información de la liberación de Se en corderos. Sin embargo, un trabajo asociado es el de Gutiérrez (2005) donde encontró que la concentración de Se en heces fue bajo e infiere que la vía fecal no fue la principal vía de excreción como pudo ser la urinaria, lo cual pudo deberse a que hubo un aporte adecuado de Se. Los corderos que recibieron el tratamiento testigo tuvieron una menor concentración de Se en orina, pero la principal vía de excreción fue en heces. Esto coincide con lo reportado por Krishnamurti (1997) quien menciona que las posibles fuentes de Se en la materia fecal son endógenas e incluyen secreciones biliares, pancreáticas, en saliva, células de la sangre y la

movilización en los tejidos. Los precursores de estas secreciones se derivan de la circulación general o de la absorción de Se en el intestino y son nuevamente excretados en el duodeno. La excreción urinaria es un mecanismo primario para disminuir la retención de Se y así, mantener la homeostasis (NRC, 1983).

1.5 CONCLUSIONES

- La suplementación de Se orgánico a la dieta de corderos no incrementó la concentración de Se en los diferentes tejidos evaluados, ni modificó la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en sangre.
- Adicionar Se en forma orgánica (selplex) mejora el balance de Se, aunque no se vio reflejado en la actividad de la glutatión peroxidasa, ni en la concentración de Se en tejidos.

1.6 LITERATURA CITADA

- Baeza Hernández Ma. Gabriela. 2005. Validación de un método es un horno de microondas para la cuantificación de selenio por absorción atómica en materia prima y fluido ruminal. Tesis. UNAM.
- Cousin, F.B., y I. M. Cairney. 1961. Some aspects of selenium metabolism in sheep. *Australian Journal Agricultural Research*. 12:927
- Gunter, S. A., P. A. Beck, y J. M. Phillips. 2003. Effects of supplementary selenium source on the performance of blood measurements in beef cows and their calves. *J. Anim. Sci.* 81:856–864.
- Gutierrez, O. C., S. A. Spross, M. R. Rosiles, W. A. Ducoing y H. A. Ortiz. 2005. Selenio sanguíneo y fecal en ovinos a partir de comprimidos inorgánicos intrarruminales. *Veterinaria México*. 36 (3) 313:324.
- Harrison, J. H., y H. R. Conrad. 1984. Effect of selenium intake on selenium utilization by the nonlactating dairy cow. *Journal Dairy Science*. 67:219-223.
- Ivancic, J., y W. P. Weiss. 2001. Effect of dietary sulfur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 84:225-232.
- FDA. 2005. CVM update. FDA permits the use of selenium yeast in sheep and goat feed. Disponible en: http://fda.gov/cvm/CVM_Updates/SEsheep.htm.
- Juniper, D. T., R. H. Phipps, E. Ramos-Morales, y G. Bertin. 2008. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J Anim Sci*. 86:3100-3109.
- Juniper, D. T., R. H. Phipps, D. I. Givens, A. K. Jones, C. Green y G. Bertin. Tolerance of ruminant animals to high dose in feed administration of a selenium enriched yeast. *J Anim Sci* 2008. 86:197-204.
- Krishnamurti, C. R., C. F. Ramberg, M. A. Shariff y R. C. Boston. 1997. Compartmental Model Depicting Short-Term Kinetic Changes in Selenium Metabolism in Ewes Fed Hay Containing Normal or Inadequate Levels of Selenium. *J. Nutr.* 127: 95 - 102.

- Kincard, R. L. 1995. The biological basis for selenium requirements of animals. *Journal Animal Science*. 11:26.
- Langlands, J. P., G. E. Donald, J. E. Bowles y A. J. Smith. 1986. Selenium excretion in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 37. 201-209.
- MacPherson A., y J. S. Chalmers. 1984. Methods of selenium supplementation of ruminants. *Veterinary Record*. 115:544-546
- Mendoza, M. G. D., V. R. Ricalde y M. T. Arroyo. 1995. Prediction of dry matter intake based on rumen evacuation. *Small Ruminant Research*. 18:133-136.
- NRC. 1983. Selenium in nutrition. Rev ed. National Academy of Science-National Research Council, Washington, D.C.
- Patterson, B. H., O. A. Levander, K. Helzlsouer, P. A. McAdam, S. A. Lewis, P. R. Taylor, C. I. Veillon y L. A. Zech. 1989. Human selenite metabolism: a kinetic model. *AM. J. Physiol*. 257:556-567.
- Pérez, Becerril Fabiola. 2007. Estudios de perfiles de Se en sangre y líquido ruminal de bolos de selenato de bario. Tesis. UNAM.
- Pope, A.L., R. J. Moir, M. Somers, E. J. Underwood y C. L. White. 1979. The effect of sulphur on Se absorption and retention in sheep. *The Journal of Nutrition*. 109:1448-1455.
- Quin, S., J. Gao y K. Huang. 2007. Effects of different selenium sources on tissue selenium concentrations, blood GSH-Px activities and plasma interleukin levels in finishing lambs. *Biol. Trace Elem. Res*. 116:91-10.
- Sarabia, Martínez Miriam. 2004. Desarrollo de un bolo intrarruminal de liberación prolongada con selenio orgánico de levaduras para bovinos productores de leche. Tesis. UNAM.
- SAS Institute. 2000. Statistical Analysis System. The SAS system for Window release 8.0. USA.558.
- Suzuki, K. T., e Y. Ogra. 2002. Metabolic pathway for selenium in the body: Speciation by HPLC-ICP-MS with enriched Se. *Food Addit. Contam.* 19:974-983.

- Taylor, J. B. 2005. Time-dependant influence of supranutritional organically bound selenium on selenium accumulation in whether lambs. *J. Anim. Sci.* 83:1186–1193.
- Urban Sánchez Rafael. 2005. Desarrollo de un método para la determinación de selenio componentes presente en una muestra de levadura enriquecida con selenio.
- Van Ryssen, J. B. J., J. T. Deagen, M. A. Beilstein y P. D. Whanger. 1989. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. *J. Agric. Food Chem.* 37:1358–1363.
- Weiss, W. P. 2003. Selenium nutrition of dairy cows: Comparing responses to organic and inorganic selenium forms. En *Proc. 19th Alltech Annu. Symp. Nutr. Biotechnology in the Feed and Food Industries*. P. Lyons, y K. A. Jacques, Ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 333-343.

CAPITULO II

(EXPERIMENTO 2)

Sobredosificación accidental de selenio con bolos intrarruminales de carragenina y selenio inorgánico en corderos

RESUMEN

La forma química del selenio (Se) refleja su disponibilidad en el organismo, por lo tanto, el objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de selenito de sodio y selenato de bario en bolos intrarruminales. Los tratamientos fueron: T1) bolos intrarruminales sin Se (placebo); T2) bolos intrarruminales con selenito de sodio; T3) bolos intrarruminales con selenato de bario. Se utilizaron 12 corderos (30.5 ± 2.09 Kg) y la concentración de Se en tejidos fue analizada con un diseño completamente al azar con tres tratamientos y cuatro repeticiones, la actividad de glutatión peroxidasa se analizó mediante el procedimiento Mixed de SAS (SAS, 2000). No se presentaron diferencias en la concentración de Se en musculo y pulmón, en tejido cardiaco el selenito de sodio acumulo más Se ($p < 0.05$), y en hígado fue mayor para Selenato de bario. Para actividad de glutatión peroxidasa no se presentaron diferencias ($p < 0.05$) entre tratamientos. El análisis por efecto tiempo presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) en el día 15 para selenato de bario. Se realizaron exámenes de toxicología clínica y se presentó: Pericarditis, hidropesía, ictericia, flacidez del músculo cardiaco, hiperventilación en pulmones, presencia de flujo de líquido biliar así como brillo en la vesícula.

Palabras clave: bolos intrarruminales, selenito de bario, selenito de sodio, tejidos, glutatión peroxidasa, toxicidad

ABSTRACT

The chemical form of selenium (Se) reflects their availability in the body, therefore, the research objective was to evaluate the effect of bolus of selenite of sodium and selenite of barium. The treatments were: T1) intraruminal bolus without Se (placebo), T2) intraruminal bolus with selenite of sodium, T3) intraruminal bolus with selenite of barium. We used 12 lambs (30.5 ± 2.09 kg) and the concentration of Se in tissues was analyzed with a completely randomized design with three treatments and four repetitions of glutathione peroxidase activity were analyzed using the mixed procedure of SAS (SAS, 2000). There were no differences in the concentration of Se in muscle and lung, heart tissue sodium selenite accumulate more Se ($p < 0.05$), and liver was higher for selenium. For glutathione peroxidase activity did not show differences ($p < 0.05$) between treatments. The time effect analysis showed significant differences ($p < 0.05$) on day 15 for selenium. Tests were conducted and presented clinical toxicology: pericarditis, dropsy, jaundice, heart muscle flaccidity, hyperventilation of the lungs, the presence of bile fluid flow and glow in the gallbladder.

Key words: intraruminal bolus, barium selenite, sodium selenite, tissues, glutathione peroxidase, toxicity

2.1 INTRODUCCION

El selenio (Se) se considera el mineral traza más tóxico; la intoxicación aparece en forma crónica o aguda por una excesiva suplementación o por consumo de alimentos o forrajes ricos en Se (Underwood 2003). El nivel máximo tolerable se incremento de 2.0 (NRC 1980) a 5.0 mg kg⁻¹ de materia seca (NRC 2005). Este valor se estableció considerando la salud del animal. Sin embargo, se reporta que valores más bajos son necesarios para evitar la acumulación excesiva en los tejidos destinados al consumo humano (NRC 2005). El mecanismo de toxicidad de Se reportado por Valadez (2005), considera que, el mineral en las reacciones de oxidación y reducción en el organismo inhibe la actividad enzimática. Gutiérrez et al. (2005) reportan que utilizar bolos como suplemento de Se no tiene efectos negativos en la salud de los animales y la duración de liberación depende de la concentración de Se que contienen, es decir, a mayor concentración del mineral se incrementa la duración del bolo. Las fuentes inorgánicas de Se permitidas para ganado son selenito y selenato de sodio y selenato de bario (FDA, 2004). La efectividad del selenito y selenato de sodio son similares, pero el selenato posee menor toxicidad, es menos irritante y tiene una mayor disponibilidad (Judson 1991), aunque, el selenato se emplea con menor frecuencia, porque se reduce fácilmente y puede formar compuestos insolubles con otros metales (Pérez 2007).

Según lo reportado por Asheesh et al. (2006) dietas que contienen una concentración de Se mayor a 2.2 mg kg⁻¹ pueden ser tóxicas. La ingestión de 1 a 2.2 mg de Se kg⁻¹ de peso vivo, como selenito de sodio, puede causar mortalidad en ovinos. La dosis media letal de selenito de sodio para esta especie (LD50) es de 1.9 1.2 mg de Se kg⁻¹ de peso vivo. Una toxicidad aguda se manifiesta por un bajo crecimiento, un alto contenido del mineral en tejidos, vómito, respiración agitada, espasmos tetánicos, paso anormal y muerte (NRC 2005). La toxicidad crónica de Se causa pérdida

de peso, y de lana o pelo (Asheesh et al. 2006). También, se afecta la respuesta de anticuerpos así como a la proliferación de células T (Yaeger et al. 1998). A pesar de muchos años de investigación, los mecanismos de toxicidad de Se aun no son claros. Raisbeck (2000) menciona que existen tres posibilidades. La primera es la posible sustitución de Se por Azufre, por sus propiedades químicas similares, en reacciones y estructuras bioquímicas importantes tales como enlaces de disulfuro, puede interrumpir la integridad normal de la función celular. También, se considera que el sulfuro se sustituye por Se en la queratina, provocando anomalías en el pelo y pezuñas. En segundo lugar, la reacción entre selenito y glutatión consume o agota los límites de las proteínas, afectando actividades enzimáticas relevantes (Vernie et al. 1978). La última, considera que los radicales libres tales como aniones superóxido se pueden producir pasando por reacciones de ciertas formas de Se en los tejidos, causando lesiones oxidativas en estos. (Hoffman 2002). Esta hipótesis de la oxidación ha recibido importante atención. Sin embargo, cualquier teoría por sí sola no puede explicar todos los mecanismos de acción. Las concentraciones urinarias de Se son buenos indicadores en caso de toxicidad para este mineral, debido a los mecanismos homeostáticos que participan en la ruta de excreción de Se (Store 1992). En muestras de tejidos tomadas por biopsia o necropsia, las concentraciones de Se se incrementan en el siguiente orden: músculo esquelético, hígado y del riñón (Ullrey 1987). Los cambios histopatológicos en corderos reportados por Tiwary (2006) manifestaron necrosis multifocal aguda del miocardio, vasculitis alveolar pulmonar con edema pulmonar y hemorragia, hígado medianamente congestionado, áreas con acumulaciones de linfocitos en el intersticio del miocardio. No se encontraron lesiones histológicas relevantes en secciones del cerebro, hígado, riñón, glándula suprarrenal, nodo linfático, bazo, páncreas, tiroides, músculo esquelético, abomaso, duodeno, yeyuno, íleon y ciego. Una de las formas de suplementación de Se es a través de bolos intrarruminales, los cuáles permiten que el mineral se

libere en forma prolongada, es decir, que durante un tiempo determinado el Se incluido en el bolo se libera lentamente y en dosis adecuada. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de Se a través de bolos intrarruminales, con un vehículo de carragenina y selenio en forma de selenito de sodio o selenato de bario, considerando los efectos en la concentración de Se en tejidos, actividad de glutatión peroxidasa y signos de toxicidad en corderos.

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1 Animales y manejo.

Se utilizaron 12 corderos machos, de pelo y raza indefinida, con peso promedio inicial de 30.5 ± 2.09 Kg. Confinados en jaulas metabólicas individuales, equipadas con comedero y bebedero. A los corderos se les realizó una cirugía para colocarles una cánula en el rumen. Los corderos recibieron una ración de 1.08 kg de alimento base seca distribuido en dos porciones al día. El consumo de agua fue a libre acceso.

2.2.2 Planteamiento experimental y composición de los bolos intrarruminales utilizados

Los corderos fueron distribuidos en tres grupos: 1. Implantación de un bolo por animal que no contenía Se en su composición (placebo). 2. Implantación de un bolo por animal elaborado con selenito de sodio (45 % de Se). 3. Implantación de un bolo por animal con selenato de bario (27.6 % de Se). Ambos fuentes de Se a una dosis de 12 mg kg⁻¹ PV. La dieta base administrada a todos los corderos se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Composición de la dieta experimental base ofrecida a corderos suplementados con bolos intrarruminales de selenito de sodio y selenato de bario

Ingrediente (MS)	%
Maíz quebrado	50.00
Heno de alfalfa	33.00
Pasta de soya	15.00
Mezcla mineral sin Se	2.00

Composición nutrimental calculada (MS)	
Proteína cruda , %	19.07
FDN, %	31.90
FDA, %	15.03
Cenizas, %	6.33
Se, ppm	0.33

Los bolos intrarruminales se elaboraron en las instalaciones del LEM-Farmacia en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM. La dosis de Se utilizada fue de 12 mg kg⁻¹ PV, es decir de 366 mg/animal ajustada de la siguiente manera a las fuentes de Se utilizadas como se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Composición porcentual de los bolos intrarruminales utilizados

Ingredientes	T1	T2	T3
Selenito de Na	-----	5.36	-----
Selenato de Ba	-----	-----	8.47
Hierro	39.77	37.64	36.41
Carragenina	10.47	9.90	9.58
Methocel 15M	10.47	9.90	9.58
Avicel pH 200	37.20	35.20	34.05
Estereato de Mg	0.52	0.49	0.48
Talco	1.57	1.48	1.44

2.2.3. Variables de estudio.

2.2.3.1. Administración de bolos.

Los bolos intrarruminales fueron introducidos a través de la cánula ruminal, dirigiéndolos a la parte centro caudal del rumen. Fueron cubiertos con una malla de plástico con un poro de 1mm de

diámetro y se suspendieron dentro del rumen sujetándolo con un hilo de plástico, esta técnica se hizo con el propósito de no perder el bolo y poder medir la degradabilidad de éste durante el tiempo.

2.2.3.2 Signología clínica de toxicidad (Histopatología)

Durante el proceso del experimento los bolos de carragenina fueron degradados en menos de 24 horas, se esperaba que estos se fueran liberando por un tiempo más prolongado, sin embargo no ocurrió lo esperado y la dosis de selenio que contenían los bolos se liberó súbitamente en un día. Esta dosis sobrepasó los niveles máximos tolerables, presentándose la muerte de un animal en el grupo de bolos con selenito de sodio y la intoxicación aguda de todos los demás. Del animal que murió inmediatamente y posteriormente todos los demás fueron sacrificados en el día 37, se tomaron muestras de musculo cardiaco, esquelético, pulmón y riñón, las cuales fueron colocadas en una solución de formaldehido al 10 % y posteriormente se procesaron en el laboratorio de Histopatología de la Universidad Nacional Autónoma de México, se efectuaron cortes de 5 μ m que se tiñeron con hematoxilina-eosina.

2.2.3.3 Actividad de Glutación Peroxidasa (GSH-Px) en sangre

Las muestras de sangre fueron tomadas desde un día antes de que los corderos se les introdujera los bolos y posteriormente a intervalos de 7 días hasta que concluyó el experimento al día 35. La sangre fue colectada en tubos vaccoutainer con anticoagulante.

2.2.4 Análisis de laboratorio

Las muestras se analizaron en el laboratorio de la Sección de Química Analítica de la FES Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México. La actividad de glutatión peroxidasa se determinó con la técnica utilizada por Sarabia, 2002. Para determinar el contenido de Se se realizó

la digestión de cada tejido en el Horno Mars5. Después de ello, se efectuó la lectura de las muestras en un espectrofotómetro de absorción atómica Varian® SpectraAA 800.

2.2.5 Diseño experimental, modelos y análisis estadísticos.

Los corderos se distribuyeron en tres tratamientos con cuatro repeticiones, bajo un diseño completamente al azar. Para la variable concentración de Se en tejidos se utilizó un diseño completamente al azar con 3 tratamientos y 4 repeticiones cada uno. Los resultados fueron analizados con el procedimiento de modelo general lineal (SAS Institute 2000). Las diferencias entre medias de tratamientos encontradas en el análisis de varianza (ANOVA), fueron separadas mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta correspondiente al i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición

μ = constante que caracteriza a la población

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

$i=1, 2$

E_{ij} = Efecto del error del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición

$j= 1, 2, 3, 4.$

La variable actividad de glutatión peroxidasa, fue medida a través del tiempo y fue analizada con el procedimiento Mixed de SAS (SAS Institute 2000).

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + R_j + A_{ij} + P_k + (TP)_{ik} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable de respuesta correspondiente al i-ésimo tratamiento, de la j-ésima repetición, en el k-ésimo período

μ = constante que caracteriza a la población

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

$i = 1, 2$

R_j = Efecto de la j-ésima repetición

$j = 1, 2, 3, 4$

A_{ij} = Efecto de la j-ésima repetición en el i-ésimo tratamiento

P_k = efecto del k-ésimo período

TP_{ik} = efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento por el k-ésimo período

E_{ijk} = error experimental

Para la variable signología clínica no se utilizó análisis estadístico, debido a que solo fue descriptiva.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Sinología clínica de toxicidad. Descripción de casos

Todos los animales presentaron signos clínicos de intoxicación. Uno de ellos murió inmediatamente, los demás presentaron un olor característico a metal, laminitis pezuñas calientes y disminución del apetito. Los resultados de histopatología se muestran en el Cuadro 9, indicando los cambios de distrofia muscular nutricional (DMN) en tejido cardiaco y músculo esquelético.

Cuadro 9. Lesiones en tejidos de corderos suplementados con bolos intrarruminales de selenito de sodio y selenato de bario.

Testigo	Tejido cardiaco	Músculo esquelético
Repetición 1	+	++
Repetición 2	+	+
Repetición 3	+	+
Repetición 4	++	++
Selenito de Sodio		
Repetición 2	++	++
Repetición 3	++++	+
Repetición 4	±	+
Selenato de Bario		
Repetición 1	++	++++
Repetición 2	++	+++
Repetición 3	±	+++
Repetición 4	++	+++

Nivel de lesiones: - Sin lesiones. ± Muy pocas. + Pocas. ++ Medianas. +++ Altas. ++++ Muy altas.

El día seis del experimento, el animal que correspondía al grupo de tratamiento con bolo intrarruminal de selenito de sodio, murió por intoxicación. A la necropsia se encontró: pericarditis, hidropesía, ictericia, flacidez del músculo cardíaco, hiperventilación en pulmones, se constató flujo de líquido biliar a pesar del brillo de la vesícula (figura 1), el riñón se encontró de tamaño normal.

Posteriormente en el laboratorio se realizó la histopatología de los tejidos de este animal intoxicado. El pulmón presentó hiperemia, edema y hemorragia severa, con completa distorsión de la estructura alveolar, los alvéolos no eran delimitables. En el hígado se observó ligera hiperemia, poliploidia y proliferación de canálculos biliares lesiones que caracterizan la presencia de aflatoxinas en la dieta y se observó en distribución multifocal necrosis de coagulación, lesión compatible con la intoxicación por Se.

En riñón ocurrieron los cambios más dramáticos con hiperemia y hemorragias cortico-medulares; los glomérulos se presentaron hiperémicos e hinchados, ocupando todo el espacio de la cápsula de Bowman; los túbulos contorneados proximales y distales presentaban una severa necrosis de coagulación, que contrastaba con colectores y asas de Henle que se presentaron conservados tanto a nivel cortical como medular.

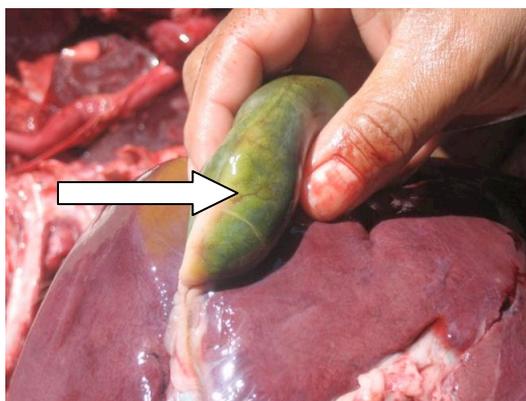


Figura 1. Brillantez en vesícula biliar a la necropsia de un cordero intoxicado con selenito de sodio

En el caso del cordero intoxicado por Se, es probable que las lesiones muy evidentes, presentes en el miocardio, hayan sido consecuencia más del efecto tóxico que de la carencia de Se. La proliferación de núcleos es un buen indicador de la presencia de DMN, consecuencia del cambio adaptativo del animal deficiente de Se y persiste aún en los animales suplementados.

2.3.2 Concentración de Se en tejidos

En el Cuadro 10, se presentan las concentraciones de Se en tejidos de corderos suplementados con selenito de sodio y selenato de bario, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en la concentración en músculo y pulmón por efecto de la forma química del suplemento utilizado. En tejido cardíaco, los corderos que recibieron el selenito de sodio acumularon más Se ($p<0.05$), seguido de aquellos que recibieron el suplemento en forma de Selenato de bario y en menor proporción los que no fueron suplementados.

La concentración de Se en el hígado fue mayor ($p<0.05$) para aquellos corderos que recibieron Selenato de bario, en relación a los que recibieron selenito de sodio y el testigo. En riñón, la concentración fue inversa a la del hígado, debido a que la mayor concentración de Se se presentó en los corderos que recibieron la dieta testigo ($p<0.05$) y los corderos que recibieron el suplemento de Se en forma de selenito o Selenato, no presentaron diferencias entre ellos ($p>0.05$; Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentración de Se en diferentes tejidos de corderos suplementados con selenito de sodio y selenato de bario con bolos intrarruminales

Tratamiento	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón
Testigo, ppb	69.43 c	678.49 b	314.50 a	264.53 a	687.97 a
Selenito de sodio, ppb	389.51 a	1098.08 b	258.39 a	290.11 a	211.77 b
Selenato de bario, ppb	332.55 b	2924.93 a	192.28 a	225.21 a	84.08 b
EEM	11.96	393.86	43.60	71.95	42.88

EEM= error estándar de la media. Medias con distinta literal son diferentes ($p < 0.05$)

2.3.3 Actividad de glutatión peroxidasa en sangre.

La actividad de glutatión peroxidasa en los corderos suplementados se presenta en el Cuadro 11 y la Figura 2. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$), en los promedios, entre los grupos experimentales. Sin embargo el análisis por efecto tiempo presenta variabilidades y solamente se presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) en el día 15 del experimento, siendo la mayor concentración para el grupo con selenato de bario.

Cuadro 11. Actividad de glutatión peroxidasa en sangre medida en diferentes periodos de tiempo en corderos con aplicación de bolos de selenito de sodio y selenato de bario durante 35 días.

Tratamiento	Actividad de Glutatión (nmoles NADPHox/min*ml de sangre)
Testigo	62.82
Selenito de sodio	69.04
Selenato de bario	70.46

Análisis de varianza	
Efectos	Valor de P
Tratamiento (T)	0.7844
Periodo (P)	0.0002
T x P*	0.0018

*Los resultados de la interacción se muestran en la figura 2.

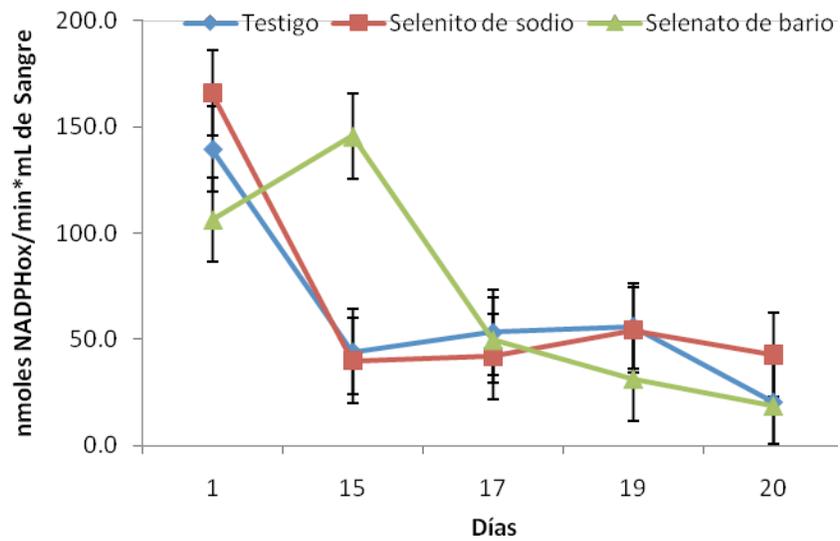


Figura 2. Interacción de la actividad de GSH-PX en sangre medida en diferentes periodos de tiempo en corderos con aplicación de bolos de selenito de sodio y selenato de bario

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Sinología clínica de toxicidad. Descripción de casos

El NRC (2007) reporta 5.0 mg/kg de MS como la dosis máxima tolerable de Se. Sin embargo, una serie de estudios han evaluado la administración a largo plazo de altas dosis de Se, en forma de selenito de sodio en ovejas (Cristaldi et al. 2005, Davis et al. 2006) y mencionan que el nivel de tolerancia en corderos está por arriba de la recomendación del NRC.

Los principales cambios histopatológicos en corderos que manifiestan signos clínicos por toxicidad de Se incluyen una aguda necrosis multifocal del miocardio, así como vasculitis alveolar de los pulmones con edema y hemorragia. Según lo reportado por Raisbeck (2000) indica que el daño tóxico asociado al miocardio causado por la toxicidad por Se ha sido correlacionado de manera positiva con la concentración en corazón. Otras investigaciones señalan que la toxicidad por Se puede deberse a una falla cardiovascular y respiratoria pero el mecanismo exacto de esta acción resulta desconocido. Asheesh et al (2006), indican que el mayor cambio histopatológico en ovinos, se manifiesta necrosis multifocal del miocardio y vasculitis pulmonar con edemas y hemorragias. Las lesiones pulmonares se caracterizan como un edema perivascular multifocal, con mínimas acumulaciones de neutrófilos y fibrina dentro de algún alvéolo. El hígado se presentó medianamente congestionado. El daño tóxico al miocardio asociado con la toxicidad por Se tiene correlación positiva con la concentración de Se en el músculo del corazón. Otros investigadores han sugerido que las muertes ocasionadas por toxicidad de Se son atribuibles a una falla cardiovascular y respiratoria pero el mecanismo de esta patología sigue siendo desconocido. Esto coincide con los resultados encontrados en este trabajo, ya que se presentó una concentración mayor de Se en tejido cardiaco en los corderos que se suplementaron con bolos intrarruminales elaborados con selenito de sodio y los cambios histopatológicos fueron coincidentes con falla cardiaca congestiva.

2.4.2 Concentración de Se en tejidos.

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el testigo, en la concentración de Se encontrado en riñón, corazón e hígado. Tirawy et al. (2006), encontraron que al suplementar Se, la concentración en hígado se incrementó significativamente. Kyle (1990) reportó que en 3 corderos que fueron accidentalmente intoxicados por selenito de sodio, se presentaron concentraciones en rangos de 7.1 a 10.8 ppm para hígado; de 3.3 a 5.5 en riñón y de 3 a 5 ppm en corazón. Por otro lado, Davis et al, (2008) encontraron concentraciones de Se más altas en hígado, y posteriormente en riñón, corazón, bazo, cerebro y diafragma. El tejido cardiaco presentó un rango muy amplio de Se, de 1.59 a 33.93 ppm en corderos que recibieron selenito de sodio y Se orgánico.

La concentración de Se fue superior en hígado y menor en músculo esquelético. También fue significativamente mayor en todos los tejidos de los corderos suplementados en comparación con los que tenían deficiencias de este mineral en la dieta (Yeh et al, 1997). Juniper (2007) reporta que el contenido de Se utilizando Selenito de Sodio a una dosis de 0.3 mg/kg de MS, comparada con un animales sin suplementación presenta diferencias significativas en corazón e hígado. En el caso de riñón y músculo no se encontraron diferencias en la concentración de Se.

Una posible explicación es la mayor concentración de Se en riñón del grupo testigo, puede ser que el Se que llega a riñón es retenido y almacenado inmediatamente en este tejido, para evitar un mayor desbalance; mientras que en los animales suplementados, el Se se almacena en otros tejidos como el muscular y hepático, pasando en último término al tejido renal.

2.4.3 Actividad de glutatión peroxidasa

La información que existe referente a glutatión peroxidasa como método indirecto para estimar las concentraciones de Se es extensa, sin embargo los coeficientes de regresión son

variables y van de 0.4 a 0.9. Ceballos et al (1999) reportan que la correlación entre la actividad sanguínea de GSH-Px y la concentración de Se fue de 0.97.

Generalmente la respuesta de glutatión depende del estatus de Se en el animal, el estado fisiológico y la especie. Koller et al (1984) indican que la concentración de Se en sangre está estrechamente correlacionada con la actividad de GSH-PX. Sin embargo, otros autores no reportan diferencias en la actividad de esta enzima en sangre en ovejas (Van Rayssen et al., 1989; Gunter et al., 2003) con dietas suplementadas con Selenito de Sodio. Podoll et al (1992), encontraron una respuesta cuadrática en la actividad de Glutatión Peroxidasa cuando se suplementó selenito y selenato, pero no existieron diferencias significativas entre estas dos fuentes de Se; sin embargo, reportan que la actividad de GSH-PX fue diferente a través del tiempo.

2.5 CONCLUSIONES

- La forma química del suplemento de Se influye en la acumulación de este en los órganos. Los animales que recibieron una dosis excesiva de selenito de sodio ($12 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$) lo acumularon en tejido cardíaco y los que recibieron selenato de bario incrementaron la concentración en hígado.
- La utilización de selenato de bario en corderos presentó una interacción con el tiempo, incrementándose la actividad enzimática de glutatión peroxidasa, a los 15 días de experimentación. Sin embargo, este efecto no se observó al final del experimento. La mayor toxicidad, medida por presencia de lesiones en diferentes órganos, muestra que el selenato de bario es una forma química más tóxica.
- La mayor toxicidad, medida por presencia de lesiones en diferentes órganos, muestra que el selenato de bario es una forma química mas toxica, pero un animal en el tratamiento con selenito de sodio murió por intoxicación.

2.6 LITERATURA CITADA

- Ashess K.T., L. S. Bryan, E. P. Kip, F. J. Lynn y O. H. Jeffery. 2006. comparative toxicosis of sodium selenite and selenomethionine in lambs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 61-70.
- Ceballos, A., F. G. Wittwer, P. A. Contreras, E. Quiroz y H. L. Böhmwald. 1999. Actividad de Glutación Peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de Se. *Pesq. Agropec. Bras.* 34(12): 2331-2338.
- Cristaldi, L. A., L. R. McDowell, C. D. Buergelt, P. A. Davis, N. S. Wilkinson y F. G. Martin. 2005. Tolerance of inorganic selenium in wether sheep. *Small Rumin. Res.* 56:205–213.
- Davis, P. A., L. R. McDowell, N. S. Wilkinson, C. D. Buergelt, R. Van Alstyne, R. N. Weldon y T. T. Marshall. 2006. Tolerance of organic selenium by range-type ewes during gestation and lactation. *J. Anim. Sci.* 84:660–668.
- FDA. 2004. Title 21. Food and drugs: Food additives permitted in feed and drinking water of animals.
- Gunter, S. A., P. A. Beck, y J. M. Phillips. 2003. Effects of supplementary selenium source on the performance of blood measurements in beef cows and their calves. *J. Anim. Sci.* 81:856–864.
- Gutierrez, O. C., S. A. Spross, M. R. Rosiles, W. A. Ducoing y H. A. Ortiz. 2005. Se sanguíneo y fecal en ovinos a partir de comprimidos inorgánicos intrarruminales. *Veterinaria México.* 36 (3) 313:324.
- Hoffman, D. J. 2002. Role of selenium toxicity and oxidative stress in aquatic birds. *Aquatic Toxicology.* 57:11-26
- Judson, G. H. 1991. Long-acting selenium treatment for sheep. *Australian Veterinary Journal.* G8:263-265.
- Juniper, D. T., R. H. Phipps, D. I. Givens, A. K. Jones, C. Green y G. Bertin. Tolerance of ruminant animals to high dose in feed administration of a selenium enriched yeast. *J Anim Sci* 2008. 86:197-204.

- Koller, L. D., G. A. Whitbeck y R. J. Soth. 1984. Transplacental transfer and colostral concentrations of selenium in beef cattle. *Am. J. Vet. Res.* 45: 2507.
- NRC. Nutrient requirements of small ruminants. 2007. National Academy of Science-National Research Council, Washington, D.C. 134-143.
- NRC. 1983. Selenium in nutrition. Rev ed. National Academy of Science-National Research Council, Washington, D.C.
- Podoll, K.L., L. Bernard, D. E. Ullrey, S. R. DeBar, P. K. Ku y W. T. Magee. 1992. Dietary selenate versus selenite for cattle, sheep, and horses. *Journal Animal Science.* 70:1965-1970.
- Raisberck, M. F. 2000. Selenosis. *Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practice.* 16:465-480.
- Sarabia, Martínez Miriam. 2004. Desarrollo de un bolo intrarruminal de liberación prolongada con Se orgánico de levaduras para bovinos productores de leche. Tesis. UNAM.
- SAS Institute. 2000. Statistical Analysis System. The SAS system for Window release 8.0. USA. 558.
- Tiwary K. A., B. L. Stegelmeier, K. E. Panter, L. F. Jame y J.O. Hall. 2006. Comparative toxicosis of sodium selenite and selenomethionine in lambs. *Journal Veterinary Diagnostic Invest* 18:61-70.
- Underwood, E.J., y N. F. Suttle. 2003. Los minerales en la nutrición del ganado. 3ª. Edición. Editorial Acribia. España.
- Ullrey, D. E. 1987. Biochemical and Physiological Indicators of Selenium Status in Animals. *J. Anim. Sc;* 65: 1712 - 1726.
- Valadez Pérez Juan Carlos. 2005. Comparación de la forma orgánica e inorgánica de suplementación de Se sobre toxicidad de ovinos. Tesis. UNAM.

- Van Ryssen, J. B. J., J. T. Deagen, M. A. Beilstein y P. D. Whanger. 1989. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. *J. Agric. Food Chem.* 37:1358–1363.
- Vernie L. N., H. B. Ginjarr, I. T. Wilders y W. S. Bont. 1978. Amino acid incorporation in a cell-free system derived from rat liver studied with the aid of selenodiglutathione. *Biochim. Biophys.* 518 (3): 507-517.
- Yaeger J. M y D. N. Regg. 1998. The effect of subclinical selenium toxicosis on pregnant beef cattle. *Journal Veterinary Diagnostic Invest* 10:268–273.
- Yeh, J. J., Q. P. Gu, M. A. Beilstein, N. E. Forsberg y P. D. Whanger. 1997. Selenium influences tissue levels. *The Journal of Nutrition.* 127:394-402.

CONCLUSIONES GENERALES

- La suplementación de Se orgánico a la dieta de corderos mejoró el balance (absorción y retención) de Se. Aunque no se vio reflejado en la actividad de la glutatión peroxidasa, ni en la concentración de Se en los diferentes tejidos evaluados.
- La utilización de selenato de bario en corderos presentó una interacción con el tiempo, incrementándose la actividad enzimática de glutatión peroxidasa, a los 15 días de experimentación. Aunque, al final del experimento no se encontraron diferencias entre tratamientos. La forma química influye en la acumulación en los órganos, debido a que los animales que recibieron selenito de sodio acumularon más en tejido cardíaco y los que recibieron selenato de bario incrementaron la concentración en hígado. El selenato de bario es una forma química mas toxica, pero un animal en el tratamiento con selenito de sodio murió por intoxicación.

LITERATURA GENERAL CITADA

- Anderson, P. H., S. Beret y D.S.P. Patterson. 1979. Te biological selenium status of livestock in Britain as indicated by sheep erythrocyte glutathione peroxidase activity. *Veterinary Record*. 104: 235-238.
- Arthur J.R., y G. J. Beckett. 1994. New metabolic roles of selenium. *Proceedings of the Nutrition Society*. 53 615-624.
- Behene, D., y A. Kyriakopoulos. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annual Review of Nutrition*. 21:453-473.
- Chu, F. F., J. H. Doroshov y R. S. Esworthy. 1993. Expression characterization and tissue distribution of new cellular selenium dependent glutathione peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 2571-1576.
- Koenig K. M., L. M. Rode, R. D. H. Cohen y W. T. Buckley. 1997. Effects of diet and chemical form of selenium on Selenium metabolism in Sheep. *Journal Animal Science*. 75: 817-827.
- Köhrle, J. 2000. The deiodinase family: selenoenzymes regulation thyroid hormone availability and action. *Cellular and Molecular Life Science*. 57:1853-1863.
- Lei X. G., H. M. Dan, D. A. Ross, W. S. Cheng, G. F. Combs y K. R. Roneker. 1998. Dietary selenium supplementation is required to support full expression of three selenium-dependent glutathione peroxidases in various tissues of weanling pigs. *The Journal of Nutrition*. 128. 1340-135.
- MacPherson A. 1994. Selenium, vitamin E and biological oxidation. En Garnsworthy, P.C. y D. J. A. Cole. *Recent advances in Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham. 3-30
- Maylin, G. A., D. Rubin y D. Lein. 1980. Selenium and vitamin E in horses. *Cornell Vet*. 70:272-289.
- Miller, J. K.; E. Brzezinska-slebodzinska, F. C. Madsen. 1993. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *Journal of Dairy Science*. 76 (9): 2812-2823.
- Mustacich, D y G. Powis. 2000. Thioredoxin reductase. *Biochemistry Journal*. 346:1-8.

- NRC. Nutrient requirements of small ruminants. 2007. National Academy of Science-National Research Council, Washington, D.C. 134-143.
- NRC. 1983. Selenium in nutrition. Rev ed. National Academy of Science-National Research Council, Washington, D.C.
- Pope, A.L., R. J. Moir, M. Somers, E. J. Underwood y C. L. White. 1979. The effect of sulphur on Se absorption and retention in sheep. *The Journal of Nutrition*. 109:1448-1455.
- Russell, L. M. 1997. Minerals for grazing ruminants in tropical regions. University of Florida. Third edition.
- Saito, Y., y K. Takahashi. 2000. Selenoprotein P: its structure and functions. *Journal of Health Science*. 46: 409-413.
- Schwarz, K. y Foltz, C. M. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Anim. Chem. Soc.* 79: 3292-3293.
- Underwood, E.J., y N. F. Suttle. 2003. Los minerales en la nutrición del ganado. 3ª. Edición. Editorial Acribia. España.
- Ullrey, D. E. 1987. Biochemical and Physiological Indicators of Selenium Status in Animals. *J. Anim. Sc*; 65: 1712 - 1726.
- Yeh, J. J., Q. P. Gu, M. A. Beilstein, N. E. Forsberg y P. D. Whanger. 1997. Selenium influences tissue levels. *The Journal of Nutrition*. 127:394-402.

ANEXOS

ANEXO 1. Procedimiento para la digestión ácida en horno de microondas de muestras de sangre para la determinación de selenio.

1. Pesar 0.5 g (± 0.05 g) de muestra de sangre completa directamente en el vaso del horno de microondas.
2. Adicionar 5 ml de ácido nítrico de manera que se deslice por la pared del vaso para bajar la muestra que se pegue en las paredes.
3. Incorporar con una micropipeta 2.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30%
4. Agitar suavemente para que se homogenice la muestra y dejar reposar por 30 minutos.
5. Mover muy lentamente la muestra para agitarla nuevamente.
6. Adicionar con una micropipeta 2ml de agua desionizada para limpiar las paredes del vaso y agitar.
7. Someter a digestión ácida en el horno de microondas bajo las siguientes condiciones:
 - Etapa 1. Rampa de 4 minutos para alcanzar 140°C en 2 minutos.
 - Etapa 2. Durante 4 minutos a una temperatura de 200°C y una presión de 350
 - Etapa 3. Se mantiene una temperatura de 200°C por 4 minutos
8. Al terminar el proceso se desconecta con mucho cuidado el sensor de temperatura para retirar el carrusel del horno.
9. Llevar el carrusel a la campana extractora para dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos.
10. Transferir el contenido de cada vaso a un matraz de 25 ml enjuagando 3 veces el vaso con ácido clorhídrico 7 M
11. Llevar al aforo del matraz con ácido clorhídrico 7 molar.
12. La solución aforada se coloca en frascos de plástico previamente etiquetados.
13. Leer las muestras en el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros ese mismo día o hasta 2 días después de digerida la muestra.

ANEXO 2. Procedimiento para la digestión ácida en horno de microondas de muestras de orina para la determinación de selenio.

1. Pesar 0.5 g (± 0.05 g) de muestra de orina en el vaso del horno de microondas.
2. Agregar 5 ml de ácido nítrico de deslizándolo por la pared del vaso.
3. Adicionar 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%
4. Mover suavemente y dejar reposar por 30 minutos la muestra en el vaso.
5. Agitar lentamente nuevamente la muestra.
6. Agregar 2ml de agua desionizada por las paredes del vaso.
7. Realizar la digestión ácida en el horno de microondas bajo las siguientes condiciones:

Etapa 1. A una presión de 350 durante 2 minutos con una rampa para alcanzar 140°C en 2 minutos.

Etapa 2. Durante 4 minutos a una temperatura de 200°C y una presión de 350

Etapa 3. Se mantiene una temperatura de 200°C por 4 minutos

8. Al terminar el proceso se desconecta con mucho cuidado el sensor de temperatura para retirar el carrusel del horno.
9. Llevar el carrusel a la campana extractora para dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos.
10. Transferir el contenido de cada vaso a un matríz de 25 ml enjuagando 3 veces el vaso con ácido clorhídrico 7 M
11. Llevar al aforo del matríz con ácido clorhídrico 7 molar.
12. La solución aforada se coloca en frascos de plástico previamente etiquetados
13. Leer las muestras en el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros ese mismo día o hasta 2 días después de digerida la muestra.

ANEXO 3. Procedimiento para la digestión ácida en horno de microondas de muestras de tejidos para la determinación de selenio.

1. Cortar una muestra y pesar 0.25 g (0.05 g) de tejido (músculo, hígado, riñón, corazón pulmón) en el vaso del horno de microondas Agregar 2.5 ml de ácido nítrico de manera que las paredes se limpien.
2. Añadir 1.0 ml de peróxido de hidrógeno al 30% con una micropipeta 2.5 ml de Agitar suavemente para que se homogenice la muestra y dejar reposar por 30 minutos.
3. Agitar de manera lenta la muestra.
4. Incorporar con una micropipeta 5 ml de agua desionizada para limpiar las paredes del vaso y agitar.
5. Proceder a realizar la digestión ácida en el horno de microondas MARS5 bajo las siguientes condiciones:

Etapa 1. Rampa de 4 minutos para alcanzar 140°C en 2 minutos.

Etapa 2. Durante 4 minutos a una temperatura de 200°C y una presión de 350

Etapa 3. Se mantiene una temperatura de 200°C por 4 minutos

6. Al terminar el proceso se desconecta con mucho cuidado el sensor de temperatura para retirar el carrusel del horno.
7. Llevar el carrusel a la campana extractora para dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos.
8. Transferir el contenido de cada vaso a un matraz de 25 ml enjuagando 3 veces el vaso con ácido clorhídrico 7 M
9. Llevar al aforo del matraz con ácido clorhídrico 7 molar.
10. La solución aforada se coloca en frascos de plástico previamente etiquetados.
11. Leer las muestras en el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros ese mismo día o hasta 2 días después de digerida la muestra.

ANEXO 4. Procedimiento para la digestión ácida en horno de microondas de muestras de heces para la determinación de selenio.

14. Cortar una muestra y pesar 0.25 g (± 0.05 g) de muestra de heces directamente en el vaso del horno de microondas.
 1. Agregar 5.0 ml de ácido nítrico de manera que las paredes se limpien.
 2. Añadir 2.0 ml de peróxido de hidrógeno al 30% con una micropipeta 2.5 ml de Agitar suavemente para que se homogenice la muestra y dejar reposar por 30 minutos.
 3. Agitar de manera lenta la muestra.
 4. Incorporar con una micropipeta 2 ml de agua desionizada para limpiar las paredes del vaso y agitar.
 5. Proceder a realizar la digestión ácida en el horno de microondas MARS5 bajo las siguientes condiciones:

Etapa 1. Rampa de 4 minutos para alcanzar 140°C en 2 minutos.

Etapa 2. Durante 4 minutos a una temperatura de 200°C y una presión de 350

Etapa 3. Se mantiene una temperatura de 200°C por 4 minutos

6. Al terminar el proceso se desconecta con mucho cuidado el sensor de temperatura para retirar el carrusel del horno.
7. Llevar el carrusel a la campana extractora para dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos.
8. Transferir el contenido de cada vaso a un matraz de 25 ml enjuagando 3 veces el vaso con ácido clorhídrico 7 M
9. Llevar al aforo del matraz con ácido clorhídrico 7 molar.
10. La solución aforada se coloca en frascos de plástico previamente etiquetados.
11. Leer las muestras en el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros ese mismo día o hasta 2 días después de digerida la muestra.

ANEXO 5. Procedimiento para determinar la actividad de Glutación peroxidasa en sangre (Sarabia, 2004)

La determinación de la actividad de la enzima glutación peroxidasa fue realizada siguiendo la metodología descrita por Flohe and Günzler (1984), y Lawrence and Burk (1976). Para ello se preparó un volumen de 1000 ml de buffer de fosfatos con pH 7.0 y una mezcla de reacción.

1. Preparación de Buffer de fosfatos pH 7.0

En un matraz de aforo de 1000 ml se colocaron los siguientes reactivos:

REACTIVO	FÓRMULA	PM	1 L
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	136.1	5.4250 g
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	174.2	14.8375 g
EDTA 5.5 mM	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372.2	1.6300 g
Azida de sodio 4.7 mM	NaN_3	65.01	0.3050 g

Una vez que se colocaron los reactivos en el matraz de aforo, se agregó agua desionizada y se ajustó el pH a 7.0 con HCl 1N. Una vez ajustado el pH, se llevo a la marca de aforo con agua desionizada.

El buffer fue almacenado en un envase de vidrio con tapa a temperatura ambiente.

2. Dilución con peróxido de hidrógeno

Cada día de las determinaciones se diluyeron 33 μl de H_2O_2 al 30 % en un volumen aforado de 200 ml de agua desionizada. Esta dilución fue mantenida en el mismo matraz a temperatura ambiente durante las determinaciones.

3. Preparación de mezcla de reacción

Se realizó el cálculo necesario de reactivos para un día de trabajo (8 hrs), esto es para 30 muestras con sus respectivos 30 blancos. La mezcla de reacción fue preparada el mismo día de las determinaciones, utilizando los siguientes reactivos:

REACTIVO	PARA 60 ENSAYOS
NADPH	13.98 mg
Glutación reducido	91.98 mg
Glutación reductasa	20.9 μL
Buffer de Fosfatos pH 7.0	48.0 ml

Una vez preparada la mezcla de reacción, ésta fue mantenida en hielo durante el día de trabajo para minimizar la conversión de NADPH a NADP.

4. Procedimiento

Las muestras a procesar fueron descongeladas a temperatura ambiente y mantenidas en refrigeración durante el día de trabajo.

El espectrofotómetro UV-visible fue encendido hasta su estabilización por un tiempo de 30 min, seleccionando ambas lámparas (UV y Vis) a una longitud de onda de 340 nm.

Para cada muestra se preparó un blanco de reactivos con los siguientes componentes:

	Blanco	Muestra
Buffer de fosfatos	100 μ l	50 μ l
Muestra	---	50 μ l
Mezcla de reacción	800 μ l	800 μ l
Reposo	8 min	8 min
H ₂ O ₂	100 μ l	100 μ l
Agitar e introducir celda al espectrofotómetro		
Lectura (absorbancia inicial)	15 seg	15 seg
Lectura (absorbancia final)	5 min	5 min

Con las lecturas de las absorbancias iniciales y finales se procedió a realizar los siguientes cálculos:

5. Cálculos

Se realizó el cálculo del número de nanomoles de NADP oxidadas por minuto, por mililitro de muestra. Las fórmulas para calcular las absorbancias del blanco y de la muestra fueron las siguientes:

<i>Blanco</i>	<i>Muestra</i>
$\frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Tiempo\ total} = \frac{\Delta A_m}{min}$	$\frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Tiempo\ total} = \frac{\Delta A_m}{min}$

La diferencia de las absorbancias del blanco y de la muestra de la alícuota tomada fue multiplicada por el coeficiente de extinción de NADP, el cual es 1607.7. Esta parte del cálculo queda expresada con la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta A_m - \Delta A_b}{Alícuota\ muestra\ (ml)} * 1607.7 = \frac{nmoles\ NADPH\ oxidadas}{min * ml\ muestra}$$

Donde:

Abs_{inicial} = Absorbancia inicial a 340 nm

Abs_{final} = Absorbancia final (después de 5 minutos) a 340 nm