



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD**

GANADERÍA

ATRIBUTOS FISIOLÓGICO-REPRODUCTIVOS E INMUNIDAD POR SELENIO EN OVEJAS

EDITH RAMÍREZ SEGURA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe RAMÍREZ SEGURA EDITH, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DRA. MIRANDA JIMÉNEZ LEONOR, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis ATRIBUTOS FISIOLÓGICO-REPRODUCTIVOS E INMUNIDAD POR SELENIO EN OVEJAS

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 07 de marzo de 2018

Edith

Firma del
Alumno (a)



DRA. LEONOR MIRANDA JIMENEZ

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: Atributo fisiológico-reproductivos e inmunidad por Selenio en ovejas, realizada por el (la) alumno (a): Edith Ramírez Segura, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO (A) EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

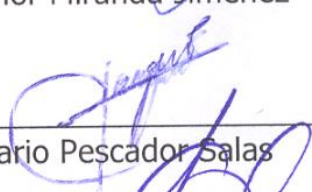
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)



Dra. Leonor Miranda Jiménez

ASESOR (A)



Dr. Nazario Pescador Salas

ASESOR (A)



Dr. David Hernández Sánchez

Montecillo, Texcoco, Edo. de Mex. marzo 2018

ATRIBUTOS FISIOLÓGICO-REPRODUCTIVOS E INMUNIDAD POR SELENIO EN OVEJAS

Edith Ramírez Segura, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de dos fuentes de selenio (orgánico e inorgánico) sobre; concentración de progesterona, inmunidad celular y fertilidad de ovejas al inicio de la época de anestro estacional. Se utilizaron 20 ovejas cruce de raza local (raza local como base genética), con peso vivo promedio de 40 ± 3.26 kg y de 3.05 ± 1.02 años de edad. Las 20 hembras se distribuyeron al azar en cuatro tratamientos (T), cada uno con cinco repeticiones, T1: Testigo; sin adición de selenio; T2: selenito de sodio; T3: levadura enriquecida con selenio en microcapsulas y T4: Levadura enriquecida con selenio, el suministro fue vía oral durante cinco días consecutivos antes de inseminar a las ovejas. Las hembras se sincronizaron con esponjas intravaginales con progestágeno sintético durante 14 días, a su retiro se aplicó eCG a cada hembra, la inseminación artificial se realizó a tiempo fijo (55 horas posteriores al retiro de las esponjas) por endoscopia. Las muestras de frotis sanguíneo se tomaron por punción de la vena yugular en cada hembra, siete días antes de la inseminación artificial y por 12 días continuos posterior a esta, posteriormente una vez por semana, por periodo de tres semanas, finalizando en los días 60 y 90 post-inseminación para realizar conteo diferencial de glóbulos blancos. La concentración de progesterona se evaluó mediante inmunoanálisis en muestras de suero sanguíneo. Se utilizó diseño completamente al azar y el análisis de datos se realizó mediante modelo mixto lineal. No existió diferencia ($P > 0.05$) entre las hembras gestantes del grupo testigo y las que consumieron levadura enriquecida con selenio microencapsulado, pero si existe diferencia ($P \leq 0.05$) con aquellas hembras a las que se suministró selenito de sodio. El grupo de hembras tratadas con selenito de sodio presentó la menor cantidad de gestaciones (40%), mientras que las hembras del grupo testigo y las que recibieron levadura enriquecida con selenio en microcapsulas presentaron 80%, alcanzándose el 100% de hembras gestantes en hembras que consumieron levadura enriquecida con selenio ($P \leq 0.05$). Los promedios de conteo diferencial de glóbulos blancos para cada día de muestreo presentaron diferencia ($P \leq 0.05$). Las células que presentaron mayor número fueron linfocitos y neutrófilos ($P \leq 0.05$). El resto de células blancas no presentó diferencia ($P > 0.05$) entre tratamiento. El selenio orgánico proporcionado a ovejas de forma oral al inicio de época de anestro estacional propicia concentraciones similares de progesterona e índices de fertilidad a las observadas en el grupo testigo, pero superior a las registradas en ovejas que recibieron selenito de sodio.

Palabras clave: Gestación, progesterona, leucocitos.

Reproductive-physiological attributes and immunity for selenium in sheep

Edith Ramírez Segura, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The objective of the present work was to determine which of the different sources of selenium (organic and inorganic) provided to sheep at the beginning of the seasonal anestrus season favors the concentration of progesterone, cellular immunity and fertility. We used 20 sheep of indefinite breed (local breed as genetic basis), average weight of 40 ± 3.26 kg PV and 3.05 ± 1.02 years of age. The 20 females were randomized into four treatments, each with 5 repetitions, T1: Control; without addition of Selenium; T2: Sodium selenite; T3: yeast enriched with selenium in microcapsules and T4: Yeast enriched with selenium, the supply was orally for five days before being inseminated. The females were synchronized with intravaginal sponges with synthetic progestogen for 14 days, when eCG was applied to each female, artificial insemination was performed at fixed time (55 hours of removal of sponges) by endoscopy. The blood smear sample was taken seven days before artificial insemination and for 12 continuous days after this, for each female by puncture of the jugular vein, then once a week for a period of three weeks, ending days 60 and 90 post-insemination to perform differential count of white blood cells. The concentration of progesterone was evaluated by immunoanalysis in our blood serum. Finding for the case of the average of pregnant females show that there is no statistical difference between the group of control females in comparison with the group that consumed enriquecidae yeast with microencapsulated selenium, but if there is difference compared to those females to which selenite was supplied. . The group of females treated with sodium selenite showed the lowest amount of gestations (40%), while the females in the control group and yeast enriched with selenium in microcapsules presented 80%, reaching 100% of pregnant females in females that consumed yeast enriched with Selenium ($P \leq 0.05$). The averages of differential white blood cell count for each day of sampling presented a significant difference ($P \leq 0.05$). The cells with the highest number were lymphocytes and neutrophils. The rest of the white cells showed no difference between treatments. The organic selenium provided to sheep orally at the beginning of the seasonal anestrus season favors similar concentrations of progesterone and fertility indices to those observed in the control group, but higher than those recorded in sheep that received sodium selenite.

Key words: Gestation, progesterone, leukocytes.

DEDICATORIA

*A Santi y Max, lo más bello de mi vida
Papá Martín y mamá Mari por su amor y apoyo incondicional.
Los amo*

AGRADECIMIENTOS

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios y para la realización de la investigación.

Al Colegio de Postgraduados y en especial al programa de Ganadería por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A mi consejo particular y muy especialmente a la Dra. Leonor por su apoyo incondicional, consejos y amistad durante el desarrollo de la investigación.

A los productores Andres Rodriguez Baños y Enrique Peralta Zacate por prestar sus animales para la investigación.

A mis compañeros Alfredo, Rigoberto y Francisca por su apoyo en el trabajo de campo y a Monse y Javi por su amistad y apoyo en el análisis de los datos.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE CUADROS	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Sistema inmune.....	2
2.1.1 La inmunidad durante la gestación.....	3
2.1.2 Inmunidad en la oveja	6
2.1.2.1 Eritrocitos	7
2.1.2.2 Hemoglobina	8
2.1.2.3 Leucocitos	9
2.1.2.4 Neutrófilos.....	11
2.1.2.5 Eosinófilos.....	12
2.1.2.6 Basófilos.....	13
2.1.2.7 Monocitos.....	13
2.1.3 Proceso inflamatorio como respuesta inmune.....	14
2.2 Acción del selenio en la inmunidad.....	15
2.3 Acción del selenio en la inmunidad.....	16
2.4 El selenio y su importancia en la reproducción.....	16
2.5 Estrés oxidativo	17
2.5.1 Radicales libres	17
2.5.2 Especies de oxígeno reactivo	18
2.5.3 Especies reactivas de nitrógeno.....	18
2.6 Antioxidantes en el organismo y su relación con el daño celular	19
2.6.1 Antioxidantes	19
2.6.2 Antioxidantes enzimáticos	19
2.6.3 Antioxidantes no enzimáticos	19
2.6 Relación del estrés oxidativo en la reproducción	20
2.7 Presencia de radicales libres en el desarrollo folicular	21

2.8	Ovulación	22
2.9	Integridad del cuerpo lúteo y producción de progesterona	22
2.10	Acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la esteroidogénesis del CL ..	24
2.11	Función de las enzimas antioxidantes en el cuerpo lúteo para el establecimiento de la gestación.....	27
2.12	Función de ROS durante la fecundación, implantación y sobrevivencia embrionaria.....	28
2	HIPÓTESIS	31
3	OBJETIVO GENERAL.....	31
4.1	Objetivos Específicos.....	31
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1.	Localización	32
5.2.	Manejo de los animales durante la investigación	32
5.3.	Tratamientos experimentales	33
5.4.	Sincronización de estros	33
5.5.	Obtención de muestras de sangre, suero y frotis sanguíneo.....	33
5.6.	Variables evaluadas	35
5.6.1	Porcentaje de hembras gestantes	35
5.6.2	Conteo de diferencial de glóbulos blancos en frotis sanguíneo	36
5.6.3	Determinación de P ₄	36
5.7.	Modelo y análisis estadístico.....	36
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1	Porcentajes de hembras gestantes	38
6.2	Conteo diferencial de glóbulos blancos en frotis sanguíneo	41
6.3	Concentración de progesterona en plasma sanguíneo de ovejas gestantes.....	45
7.	CONCLUSIONES.....	47
8.	RECOMENDACIONES	47
9.	LITERATURA CITADA.....	48

LISTA DE FIGURAS

Cuadro 1. Valores normales de células en el paquete sanguíneo en ovejas	6
Cuadro 2. Número total de leucocitos y recuentos diferenciales normales en cabras (informes en diferentes países).....	7
Cuadro 3. Tratamientos (T) experimentales	33
Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados en interacción efecto tratamiento por día para concentración de progesterona (P_4) en hembras tratadas con diferentes fuentes de selenio	45

LISTA DE CUADROS

Figura 1. Frotis sanguíneo de oveja y cabra Angora.	8
Figura 2. Frotis sanguíneo de ovejas.....	10
Figura 3. Neutrófilo de oveja.....	12
Figura 4. Eosinófilo de oveja.....	12
Figura 5. Basófilo de oveja.....	13
Figura 6. Monocito de oveja.....	14
Figura 7. Proceso de la inseminación artificial con endoscopia.....	32
Figura 8. Tinción de frotis sanguíneo.....	35
Figura 9. Número de ovejas gestantes por tratamiento.....	39
Figura 10. Ecografía del útero de ovejas.....	40
Figura 11. Conteo diferencial de glóbulos blancos.....	42
Figura 12. Promedio de linfocitos por tratamiento.....	44

ABREVIATURAS

Ad4BP. Factor de transcripción específico de tejido esteroideogénico, regula la expresión del citocromo P450 esteroideogénicos.

ADN. Ácido desoxirribonucleico

AMPc. Adenosín monofosfato cíclico

ARNm. Ácido ribonucleico

ATP. Trifosfato de adenosina

CAT. Enzima catalasa oxidoreductasa

CL. Cuerpo *lúteo*.

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

FIV. Fertilización *in vitro*

GM-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

G6PD. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GST. Enzimas glutatión-S-transferasa

GSTA1. Glutatión S-transferasa como respuesta al estrés oxidativo

GSR. Glutatión-disulfuro reductasa

GPX. Glutatión peroxidasa

GPX-Se. Glutatión peroxidasa dependiente de selenio

hCG. Gonadotropina coriónica humana

eCG. Gonadotropina coriónica equina

H₂O. Agua

H₂O₂. Peróxido de hidrógeno

HLA-G. Antígeno de histocompatibilidad HLA-G, clase I, G, también conocido como antígeno leucocitario humano G

IL. Interleucina.

LH. Hormona luteinizante

LPS. Lipopolisacáridos.

LIF. Factor inhibidor de linfocitos

M-CSF. Factor estimulador de colonias de macrófagos

MHz. Megahercio

NAD(P)H oxidasa 1 (DUOX1). Enzima cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD^+ o NADP^+ .

NF- κ B. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO. Óxido nítrico

NO₂. Dióxido de nitrógeno

NOs. Óxido nítrico sintasa

NOs1 o nNOS. Óxido nítrico sintetasa neuronal

NOs2 o iNO. Óxido nítrico sintetasa inducible

NOs3 o eNOS. Óxido nítrico sintetasa endotelial

NOS. Especies reactivas de nitrógeno

OS. Estrés oxidativo

O₂⁻. Ion superóxido

OH. Hidroxilo

P₄. Progesterona

PGF_{2 α} . Prostaglandina F_{2 α}

PIBF. Factor bloqueador inducido por progesterona

PK.C Proteína cinasa C

RBC. Conteo de glóbulos rojos

ROS. Especies reactivas de oxígeno

SOD. Enzima superóxido dismutasa

SOD1, Superóxido dismutasa 1

SOD2. Superóxido dismutasa mitocondrial o dismutasa dependiente de manganeso

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa

UGA. Codón de terminación

WBC. Conteo diferencial de glóbulos blancos

1. INTRODUCCIÓN

El selenio (Se) es un oligoelemento esencial para el crecimiento normal y la salud en seres humanos y animales; desempeña funciones biológicas tales como formación de hormonas tiroideas, síntesis de ADN, favorece la angiogénesis que estimula el aporte de nutrientes al ovocito favoreciendo la reproducción y también estimula la respuesta innata y adquirida del sistema inmunológico (Delves y Roitt, 2013).

Las deficiencias nutricionales de selenio causan alteraciones de sistemas y órganos tanto de hembras como de machos. En hembra se afecta el crecimiento, desarrollo e implantación del embrión (Sharma y Agarwal, 2004), en el caso del macho se ve afectada la espermatogénesis, además ocasionan depresión del estado antioxidante que conduce a la muerte celular.

El selenio también está implicado en los sistemas de defensa antioxidantes, protege contra el estrés oxidativo y la eliminación de especies reactivas del oxígeno, ejerce su actividad mediante el aminoácido selenocisteína el cual está incorporado a las selenoproteínas, dentro de las cuales se encuentran glutatión peroxidasa, deiodinasas yodotironina, tiorredoxina reductasa, selenoproteína P entre otras proteínas (Guerin *et al.*, 2001), importantes en la gestación normal (Reyna *et al.*, 2002).

Durante la gestación, el sistema inmunológico de la madre se altera a nivel sistémico, la inmunidad celular disminuye para aumentar la inmunidad adquirida. En hembras gestantes es en el tercer trimestre de gestación cuando los macrófagos y neutrófilos circulantes en sangre aumentan la fagocitosis y la producción de ROS, de esta manera se disminuye la inmunidad celular y se aumenta la posibilidad de adquirir infecciones intra celulares maternas (Draca, 2002) también se ha reportado que mientras aumenta la edad gestacional existe incremento de antioxidantes en sangre, pero existen pocos estudios que reporten la función del selenio en la inmunidad celular durante la gestación en pequeños rumiantes, especialmente en ovinos.

Investigaciones previas sugieren que la biodisponibilidad de selenio varía con las formas y fuentes de este mineral; formas orgánicas (selenometionina, selenocisteína, levadura enriquecida con selenio) son menos tóxicas, tienen mayor biodisponibilidad, se absorbe con facilidad y son inmediatamente metabolizadas, en contraste con formas inorgánicas; como selenito y selenato de sodio (Yue *et al.*, 2009).

Por lo anterior se considero importante evaluar el efecto de distintas fuentes de selenio proporcionadas a hembras gestantes en época no reproductiva sobre la inmunidad celular y si se afecta la disponibilidad de progesterona al inicio de la gestación que permita aumentar la implantación embrionaria.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Sistema inmune

De acuerdo a lo descrito por Delves y Roitt (2013) el sistema inmune es una organización de células y moléculas con funciones especializadas en la defensa contra la infección. Existen dos tipos de respuesta ante la invasión de agentes extraños al organismo. Las respuestas innatas (naturales) comprenden células y mecanismos que defienden al ser vivo de infecciones por diversos organismos de forma no específica; esto significa que las células del sistema innato reconocen y responden a patógenos de forma genérica, no confiere inmunidad a largo plazo y proporciona defensa inmediata; mientras que las respuestas adquiridas (adaptativas) son eficientes al ser expuestas en repetidas ocasiones a infección. Las células de respuesta innata utilizan células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células que liberan mediadores inflamatorios (basófilos, mastocitos y eosinófilos) y células asesinas naturales (NK); además de componentes moleculares que incluyen el complemento mayor de histocompatibilidad, proteínas de fase aguda y citoquinas (interferones) de acuerdo a lo reportado por Agarwal *et al.* (2005).

Las respuestas adquiridas involucran proliferación de células B y T específicas de antígeno cuando los receptores de superficie de estas células se unen al antígeno. Las células especializadas, llamadas células presentadoras de antígeno, muestran el antígeno a los linfocitos y colaboran con ellos en la respuesta antigénica. Las células B secretan inmunoglobulinas, los anticuerpos específicos de antígenos responsables de eliminar los microorganismos extracelulares; por otro lado las células T ayudan a las células B a producir anticuerpos, que eliminan patógenos intracelulares activando macrófagos y matando células infectadas por virus, por lo que actúan en conjunto tanto la respuesta innata como la adquirida para eliminar patógenos. Todas estas células se desarrollan a partir de células madre pluripotentes a nivel de hígado fetal y en la médula ósea para luego circula a través del fluido extracelular. Las células B maduran en médula ósea, mientras que las células T viajan al timo para completar su desarrollo. Las respuestas inmunes adaptativas se generan en los ganglios linfáticos, bazo y linfa, en los dos primeros se lleva a cabo la activación de los linfocitos por el antígeno (Agarwal *et al.*, 2005; Ramírez, 2006; Delves y Roitt, 2013).

2.1.1 La inmunidad durante la gestación

La interfase materno-fetal en humanos está formada por el trofoblasto y la decidua materna, el primero expresa moléculas como: interleucina (IL-10), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y ligando de Fas (Fas-L). La decidua materna, sitio inmunológicamente privilegiado por inhibición funcional esta poblada por diversos tipos celulares: leucocitos, células del estroma y células madre mesenquimatosas. Las células del trofoblasto que están en contacto directo con el epitelio del útero reciben el nombre de sincitio-trofoblasto, las células mononucleadas restantes corresponden al citotrofoblasto (Huppertz, 2007). Las células del trofoblasto extraveloso tienen contacto con células deciduales, pero también con células inmunológicas maternas (Moffett y Loke, 2004). En la gestación normal existen células del sistema inmunológico innato en la interfase materno-fetal, estas células son necesarias para la gestación y para que haya implantación exitosa; infiltración elevada de leucocitos a este nivel puede originar complicaciones en la gestación (Abrahams *et al.*, 2005).

La placenta es la única estructura que presenta estrecha relación de sangre materna con el feto; para llevar a cabo el intercambio de nutrientes, gases y desechos, en este espacio existen diversos mecanismos de tolerancia inmunológica; entre ellos, moléculas HLA-G en las células del trofoblasto, síntesis de factores reguladores como: citoquinas y hormonas, equilibrio de citoquinas Th1 y Th2, mecanismos de apoptosis, producción del factor transformante de crecimiento beta (precursor TGF- α) con fenotipo inmunosupresor, células T reguladoras; todos estos mecanismos se relacionan entre sí y se complementan para llevar a término la gestación (Iglesias *et al.*, 2002).

Durante la gestación, el sistema inmunológico de la madre se altera y, a nivel sistémico, la inmunidad adquirida mediada por células disminuye, mientras que la innata está aumentada y activada para dar respuesta inmediata y adecuada frente a microorganismos patógenos, observándose incremento de macrófagos y neutrófilos circulantes a partir del segundo trimestre de gestación. En el tercer trimestre estas células expresan aumento de fagocitosis y con esto aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), trayendo como consecuencia disminución de la inmunidad celular y aumentando así las infecciones intra-celulares maternas (Draca, 2002).

En trabajos realizados por Abrahams *et al.* (2004) se describe que los macrófagos constituyen de 20 a 30% de los leucocitos deciduales y permanecen constantes durante la gestación, a

diferencia de las células T y NK que fluctúan durante este proceso. Los macrófagos cooperan con las células del trofoblasto durante la implantación, participan en la remodelación de la vasculatura uterina, degradan la matriz extracelular, regulan la apoptosis, remueven productos tóxicos para el desarrollo embrionario; además favorecen la tolerancia inmunológica contra el tejido fetal (Heikkinen *et al.*, 2003) y en la etapa de parto participan en la dilatación cervical inicial, a través de prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias (Nagamatsu y Schust, 2010).

Un estudio realizado por Houser *et al.* (2011), en mujeres en primer trimestre de gestación, encontraron dos subtipos de macrófagos en decidua; CD14⁺ y CD11c que expresan genes asociados con metabolismo de lípidos e inflamación que pueden secretar citosinas pro y antiinflamatorias, lo que les permite participar en la tolerancia fetal de la interfase. El subtipo CD11c corto expresa genes asociados con la formación de matriz extracelular y crecimiento tisular (Houser *et al.*, 2011).

Por otro lado, Singh *et al.* (2005), observaron que los macrófagos de la decidua aislados de tejido coriodecidual y estimulados con lipopolisacárido (LPS) unen bacterias en forma dependiente permitiendo realizar fagocitosis; cuando el LPS entra en contacto con el líquido amniótico estimula a los macrófagos de la decidua para producir fosfolipasa A2 favoreciendo la producción de prostaglandinas E2 y F2 α que pueden desencadenar parto prematuro, produciendo además IL-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-6 desencadenando respuesta inflamatoria intrauterina (Singh *et al.*, 2005).

El parto prematuro en mujeres puede ser ocasionado por mal funcionamiento de macrófagos deciduales ocasionando corioamnionitis que puede desencadenar partos entre las semanas 23 a 36 de gestación con incidencia relativamente alta. Durante la implantación, los macrófagos deciduales regulan de manera importante la apoptosis, que es crítica para el desarrollo embrionario (Abrahams *et al.*, 2004) y algunas de sus funciones favorecen la tolerancia inmunológica contra el tejido fetal (Heikkinen *et al.*, 2003).

Durante la gestación el feto es protegido por moléculas con carácter inmunomodulador, entre estas se encuentra a: la progesterona, la enzima 2-3-dioxigenasa, los radicales libres y la glicodelina. La hormona esteroidea progesterona, participa en el mantenimiento de la gestación en humanos y animales, aumenta considerablemente durante la gestación, alcanza concentraciones que disminuyen la actividad linfocitaria; funciona a través de receptor intracelular y regula, aspectos celulares y moleculares implicados en el proceso de implantación,

además de reducir la capacidad reactiva de la madre contra los antígenos fetales (Barrera *et al.*, 2000). Además, controla la receptividad del endometrio, la implantación del blastocito, el desarrollo de la placenta, el reclutamiento de células NK de la decidua, regula el reconocimiento de antígenos del CMH paterno, la polaridad de células T efectoras, la sensibilidad de células presentadoras de antígeno y suprime la actividad de los macrófagos. De lo anterior se induce la inmunosupresión a través de la producción de citoquinas tipo Th2 (Barrera *et al.*, 2000; Abrahams *et al.*, 2005).

La conexión entre el sistema inmunológico y progesterona es a través de receptores para la hormona que se encuentran en células mononucleares y en linfocitos T γ δ de sangre periférica de hembras gestantes y células NK circulantes (Szekeres-Bartho *et al.*, 2009). Para que se inicien mecanismos inmunorreguladores dependientes de progesterona es necesario reconocer de manera eficaz los antígenos fetales; concentraciones elevadas de progesterona induce la producción de citoquinas tipo Th2, factor inhibidor de linfocitos (LIF) y factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) por células T (Van den Heuvel *et al.*, 2005; Yie *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Szekeres-Bartho *et al.* (2005) describen la proteína para el factor bloqueador inducido por progesterona (PIBF), la cual se sintetiza por acción de progesterona; en linfocitos de hembras gestantes, disminuye el número de macrófagos, prostaglandinas, IL-8, GM-CSF e induce la producción de citoquinas Th2, al mismo tiempo regula los efectos inmunológicos de progesterona con actividad inmunosupresora. El PIBF permite la fosforilación del receptor de IL-4 (IL-4-R α) y de la proteína cinasa C (PKC), con activación subsecuente de la vía de señalización Jak/STAT, induciendo genes que afectan a la invasión del trofoblasto. La progesterona ejerce su acción inmunosupresora en linfocitos impidiendo la activación de NF- κ B (Szekeres-Bartho, 2009).

De acuerdo a Rico y Vega (2012) la gestación se lleva a cabo gracias a diversos mecanismos que favorecen la implantación del embrión y permiten su desarrollo durante toda la gestación, y que involucran células inmunitarias partícipes en la regulación de respuesta y tolerancia inmunitaria, al igual que en protección proporcionada por citoquinas Th2 y por moléculas expresadas en células del trofoblasto, lo cual se logra con participación conjunta de factores locales expresados en la interfase o comunicación materno-fetal; estos factores son: HLA-G; que inhibe la citotoxicidad de los linfocitos agresores e induce la apoptosis de células CD8 activadas, factor de crecimiento transformante beta; que induce tolerancia de la madre hacia el feto, los

linfocitos agresores uterinos; funcionalmente diferentes a los periféricos, asimismo, moléculas circulantes como progesterona y glicodelina, todos estos, importantes reguladores de la respuesta inmunitaria; considerado la gestación como condición inmunológica especial, donde el feto, semialogénico, evita ser rechazado inmunológicamente por la madre al inducir tolerancia (Barrera *et al.*, 2000; Draca, 2002).

2.1.2 Inmunidad en la oveja

De acuerdo a lo reportado por Byers y Kramer (2010) tanto las ovejas como las cabras, ya sean domésticas o salvajes son fácilmente manejables para la extracción y toma de muestras sanguíneas, a pesar de la precisión de los métodos de laboratorio utilizados, los valores publicados sobre intervalos hematológicos normales para ovejas y cabras varían ampliamente (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Valores normales de células en el paquete sanguíneo en ovejas

	Rango	Media
Serie eritrocítica		
Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9 – 15	12.0
Hemoglobina (g/dL)	9 – 15	11.5
PCV (%)	27 – 45	35
MCV (fL)	28 – 40	34
MCH (pg)	8 – 12	10.0
MCHC (%)	31 – 34	32.5
Diámetro RBC (μm)	3.2 – 6.0	4.5
Datos miscelares		
Proteínas en plasma (g/dL)	6.0 – 7.5	
Fibrinogeno (mg/dL)	100 – 500	
Trombocitos ($\times 10^3$)	800 – 1,100	500
Vida útil RBC (días)	140 – 150	
Mieloide: relación eritroide	0.77 – 1.7	1.1
Serie leucocítica		
Leucocitos totales ($/\mu\text{L}$)	4,000 – 8,000	12,000
Neutrófilo (banda) —		
Neutrófilo (segmentados)	700 – 6,000	2,400
Linfocitos	2,000 – 9,000	5,000
Monocito	0 – 750	200
Eosinofilo	0 – 1,000	400
Basófilo	0 – 300	50
Porcentaje de distribución		
Neutrófilo (banda)		
Neutrófilo (segmentados)	10 – 50	30
Linfocitos	40 – 55	62
Monocito	0 – 6	2.5
Eosinofilo	0 – 10	5.0
Basofilo	0 – 3	0.5

Cuadro tomado de Byers y Kramer (2010).

Cuadro 2. Número total de leucocitos y recuentos diferenciales normales en cabras (informes en diferentes países).

País	Edad	Conteo WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Neutrófilos Maduros (%)	Neutrófilos en banda (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
México	2d-7s	—	33.7 \pm 12.6	0.9 \pm 0.9	64.1 \pm 13.0	0.8 \pm 0.9	0.5 \pm 0.7	0.0 \pm 0.2
	Adulto	—	50.3 \pm 13.7	0.2 \pm 0.4	43.4 \pm 13.9	1.2 \pm 1.1	4.3 \pm 2.1	0.6 \pm 0.8
Reino Unido	1d	7.5 \pm 2.9	55.2 \pm 17.9	—	41.3 \pm 14.9	2.0 \pm 1.3	0.7	0.2
	1s	8.9 \pm 4.1	42.9 \pm 11.8	—	52.4 \pm 11.9	2.6 \pm 1.2	0.2	0.5
	1m	9.2 \pm 2.4	32.7 \pm 10.8	—	62.5 \pm 9.4	2.1 \pm 1.7	1.0	1.1
	3m	18.1 \pm 3.8	22.5 \pm 5.8	—	72.6 \pm 11.5	2.0 \pm 3.7	1.1	0.4
	2a	8.1 \pm 2.5	49.0 \pm 10.7	—	42.3 \pm 10.4	3.1 \pm 2.5	1.9	0.9
	+ 3a	9.7 \pm 2.5	47.7 \pm 12.2	—	48.2 \pm 12.0	2.2 \pm 1.0	1.5	0.2
	Adulto	13.3 \pm 2.7	43.0 \pm 6.7	—	51.0 \pm 11.4	3.0	2.0	1.0

d= día, s= semana, m= mes y a= año.

Cuadro tomado de Byers y Kramer JW (2010).

2.1.2.1 Eritrocitos

La eritropoyetina de mamífero (EPO) está genéticamente bien conservada. Los glóbulos rojos en ovejas son pequeños comparados con los de otros mamíferos y no se agregan ni se deforman fácilmente como los de otras especies (Ullery *et al.*, 1965; Archer y Jeffcott, 1977; Mock *et al.*, 2008). En la mayoría de las razas ovinas los eritrocitos tienen forma discoide (Figura 1a), mientras que en cabra Angora presentan glóbulos rojos fusiformes mezclados con glóbulos discoide (Figura 1b).

Como en otras especies, la eritropoyesis acelerada en las ovejas y las cabras va acompañada de reticulocitosis, macrocitosis, policromasia y punteado basófilo de reticulocitos (Ullery *et al.*, 1965) el punteado se demuestra mejor en frotis recién preparados, EDTA-conservados, secado al aire rápidamente y tinción de Wright o Giemsa para glóbulos rojos.

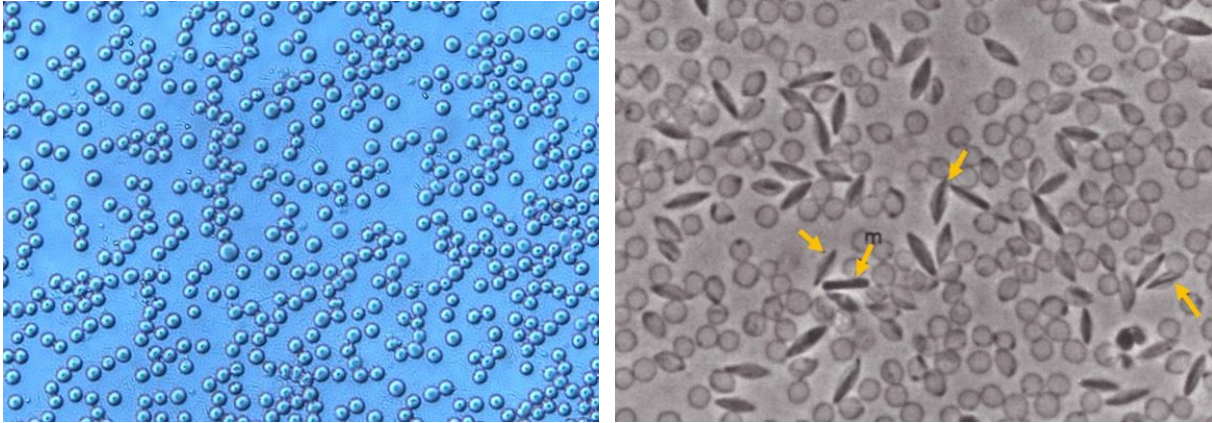


Figura 1. Frotis sanguíneo de oveja y cabra Angora. a) Frotis sanguíneo de oveja teñido con hematoxilina (Gill's III) observados con dicromía interfacial (DIF) a 40 x, b) Frotis de cabra Angora teñido con azul de metileno, en B se muestran glóbulos rojos fusiformes parcialmente lisados que contiene una barra densa polimerizada de hemoglobina (flechas), además se visualiza una célula en forma de barra (m) con hemoglobina densa (Byers y Kramer, 2010).

Las ovejas y cabras adultas aumentar la masa circulante de eritrocitos y en caso necesario, cuentan con una segunda ruta para aumentar su entrega efectiva de oxígeno a los tejidos en necesidad de hemoglobina por anemia o en respuesta a la hipoxia en estos casos los glóbulos rojos recién formados vuelven a la síntesis de hemoglobina C (HgbC) que normalmente solo se produce en la vida posnatal inmediata (Barker *et al.*, 1980; Winslow *et al.*, 1989). De acuerdo a lo revisado por Harvey (1998) el metabolismo en glóbulos rojos de animales domésticos, específicamente la oveja, tiene tasa de consumo de glucosa de $0.7 \mu\text{mol/h/mL}$ en contraste con la tasa de consumo de glóbulos rojos de caprinos que es $1.9 \mu\text{mol/h/mL}$.

2.1.2.2 Hemoglobina

Las ovejas y cabras adultas aumentar la masa circulante de eritrocitos y en caso necesario, cuentan con una segunda ruta para aumentar su entrega efectiva de oxígeno a los tejidos en necesidad de hemoglobina por anemia o en respuesta a la hipoxia, en estos casos los glóbulos rojos recién formados vuelven a la síntesis de hemoglobina C (HgbC) que normalmente solo se produce en la vida posnatal inmediata (Barker *et al.*, 1980; Winslow *et al.*, 1989). De acuerdo a lo revisado por Harvey (1998) el metabolismo en glóbulos rojos de animales domésticos, específicamente la oveja, tiene tasa de consumo de glucosa de $0.7 \mu\text{mol/h/mL}$ en contraste con la tasa de consumo de glóbulos rojos de caprinos que es $1,9 \mu\text{mol/h/mL}$.

2.1.2.3 Leucocitos

De acuerdo a Winslow *et al.* (1989) los glóbulos blancos o leucocitos son un conjunto de células sanguíneas; efectores celulares de la respuesta inmunitaria del organismo, se encuentran presentes tanto en torrente sanguíneo como en tejidos linfáticos, son producidos en médula ósea y tejido linfático. El realizar conteo de globulos blancos o leucocitos en sangre puede ayudar como indicador de presencia de alguna enfermedad o patología. Elevado número de leucocitos en sangre se llama leucocitosis, mientras que una disminución por debajo del límite inferior, se denomina leucopenia. Los globulos blancos se clasifican de acuerdo a la lobulación de sus nucleos de la siguiente manera:

- Leucocitos con núcleos sin lóbulos o también llamados mononucleares.

Linfocitos: Células leucositarias de tamaño pequeño que reaccionan frente a materiales extraños, tienen alta jerarquía en el sistema inmunitario por ser encargados de la inmunidad específica o adquirida.

Monocitos: Células agranulocíticas del paquete celular sanguíneo blanco, son generados en la médula ósea y través de la sangre emigran a diferentes órganos y tejidos (pulmones, hígado, bazo, huesos y ganglios linfáticos), su función es eliminar a diferentes microorganismos o restos celulares.

- Leucocitos con núcleos lobulados (polimorfonucleares).

Neutrófilos: de tipo granulocito, son abundantes, presentan periodo de vida corto (de horas o pocos días), su función principal es fagocitar hongos y bacterias.

Basófilos: Son poco abundantes en sangre su respuesta inmunitaria esta conferida ante alérgias, a través de la liberación de histamina y serotonina en bajas concentraciones.

Eosinófilo: Son células blancas con multiples granulos, se originan en médula ósea; al parecer por estímulo de IL-5 e IL-3 su vida media en sangre va de 3 a 4 días, son responsables en patogénesis de enfermedades alérgicas y muerte de parásitos.

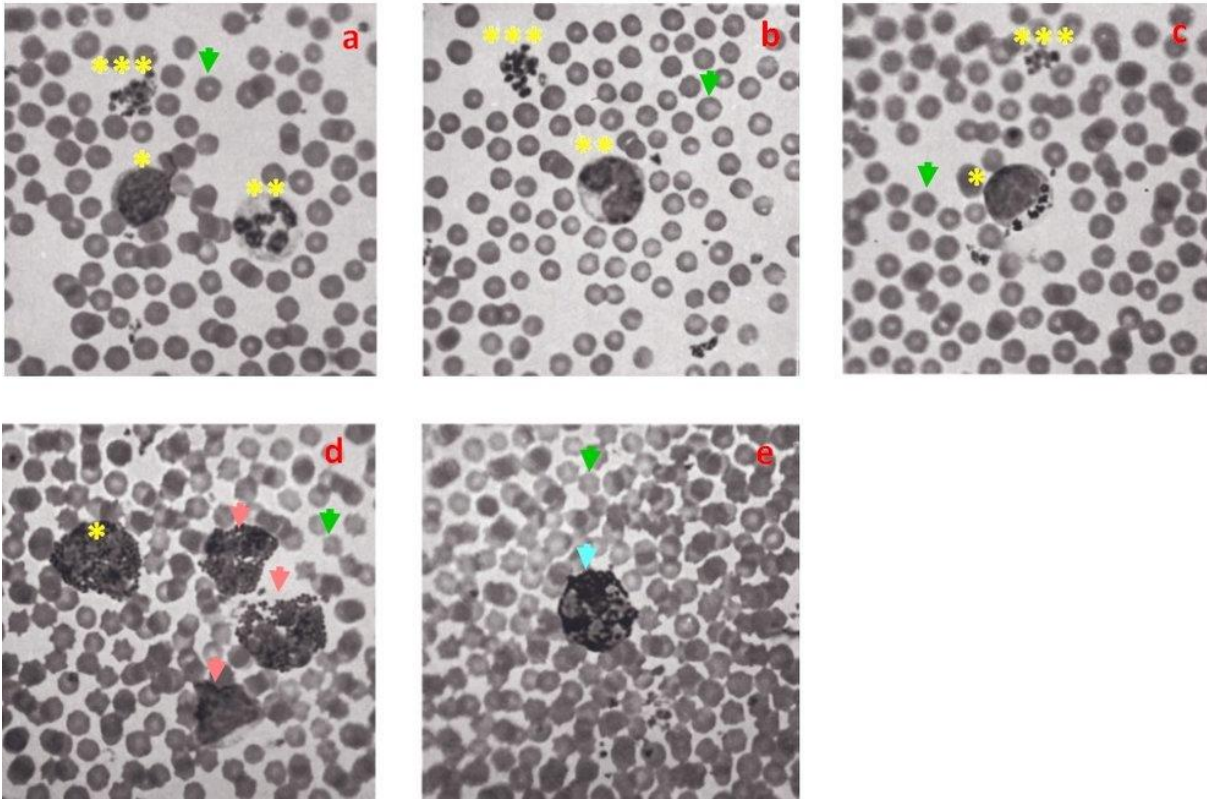


Figura 2. Frotis sanguíneo de ovejas, magnificación original (600x). Se muestran en: a) Trombocitos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas; b) monocitos, trombocitos y plaquetas; c) linfocitos con gránulos azurófilos y plaquetas; d) linfocitos, eosinofilos y plaquetas; e) basófilo y plaquetas (Byers y Kramer, 2010). Un asterisco señala linfocitos; dos asteriscos señala neutrófilos; tres asteriscos señalan trombocitos; las puntas de flecha en color verde señalan plaquetas; las puntas de flecha en color rosa indican eosinofilos; la punta de flecha azul señala célula basofila.

Por lo anterior es importante conocer los parámetros normales de la especie en estudio para determinar los factores internos o externos que los pueden alterar. El conteo diferencial de glóbulos blancos (WBC; por sus siglas en Inglés) es útil para monitoriar estados inflamatorios en ovejas y cabras, aunque también se utilizan en investigaciones realizadas con otras especies. Por su tamaño pequeño las ovejas y cabras permiten realizar investigaciones con muestras de sangre de hematopoyesis, oncología e inmunología. El conteo diferencial de células blancas tanto en ovejas como en caprinos cambia con la edad (Winslow *et al.*, 1989). Los neutrófilos son dominantes durante las primeras dos semanas de vida postnatal, las siguientes tres semanas de edad las células dominantes son linfocitos y neutrófilos: con proporción de linfocitos de 0.5 en corderos y 0.6 en niños. En las ovejas próximas a parir hay disminución en el recuento de glóbulos rojos y en WBC, como neutrofilia y linfopenia.

2.1.2.4 Neutrófilos

De acuerdo a Byers y Kramer (2010) los neutrófilos son parte esencial del sistema inmune innato, pueden destruir; cualquier invasor que se encuentre en el organismo, bacterias y parásitos, son el primer tipo de células inmunes que responde y llega al sitio de infección mediante quimiotaxis. Además del reclutamiento y la activación de otras células del sistema inmune, los neutrófilos tienen función clave en la defensa de primera línea contra los patógenos invasores. Pueden atacar a los microorganismos mediante tres métodos: fagocitosis (ingestión), liberación de agentes antimicrobianos solubles (desgranulación) y generación de trampas extracelulares de neutrófilos.

Las infecciones son diagnosticadas al realizar un recuento absoluto de neutrófilos (RAN) por ser: de los más abundantes ante una infección, además de ser observados en procesos inflamatorios y como el principal componente de pus (Ramírez, 2006).

Los resultados de un recuento absoluto de neutrófilos, puede ser bajo o alto, causado por problemas de salud. Cuando se obtienen recuentos de neutrófilos bajos, el organismo es más vulnerable a enfermedades infecciosas por bacterias y hongos, esta condición se conoce como neutropenia. Cantidades elevadas de neutrófilos provoca infecciones, inflamación o trastornos crónicos tales como leucemia mieloide crónica a esta condición se conoce como neutrofilia (Anosa, 1993; Byers y Kramer, 2010).

En investigaciones realizadas por Anosa (1993) utilizando tinciones de Wright o Giemsa en el neutrófilo de oveja, se observa el citoplasma con textura eosinofílica granular, presentan granulos primarios, secundarios y terciarios, estos últimos al ser comparados con otras especies son numerosos, grandes y densos (Figura 3). Cuando se emplea tinción citoquímica o inmunocitoquímica en neutrófilos de rumiantes se revela una gama de enzimas y sustratos, siendo la lisozima una enzima común en muchas especies, pero ausente del citoplasma de neutrófilos de ovejas y caprinos.

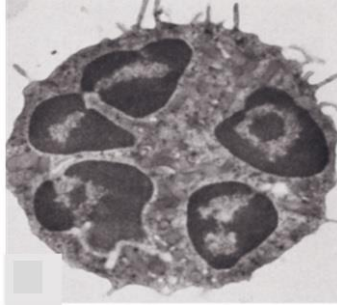


Figura 3. Imagen de un Neutrófilo de oveja con núcleo multilobulado. Se observa citoplasma lleno de gránulos primarios grandes y densos. Amplificación 14,000x. (Byers y Kramer, 2010).

2.1.2.5 Eosinófilos

De acuerdo a lo reportado por Brito *et al.* (2003) el eosinófilo presenta núcleo bilobulado característico y sus gránulos citoplásmicos son distintivos sus proteínas granulares son responsables de muchas funciones proinflamatorias, principalmente en patogénesis de enfermedades alérgicas, como célula efectora de hipersensibilidad inmediata, así como en la muerte de parásitos. Los eosinófilos interactúan con otras células por la expresión de múltiples receptores en su superficie.

En el caso de los rumiantes los núcleos de la mayoría de los eosinófilos son bilobulado y rodeados de numerosos gránulos citoplásmicos; pequeños, redondos, refráctiles contra el fondo de citoplasma basófilo escaso. Dentro de los gránulos eosinofílicos de ovejas hay estructuras cristalinas densas (Figura 2 y 4). Los ovinos y caprinos presentan respuesta inmunológica al parasitismo estacional con eosinofilia; esta eosinofilia estacional no debe ser considerada como un estado “normal” (Pernthaner *et al.*, 1995) y si como un hallazgo patológico, los rangos y media de eosinofilos se muestran en el cuadro 1.

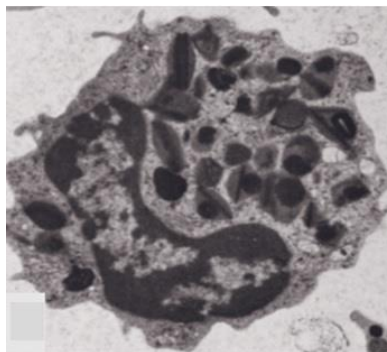


Figura 4. Imagen de un Eosinófilo de oveja caracterizado por gránulos pleomórficos con barras cristaloides y espirales membranosas, escasos organelos celulares. Amplificación 12,000x. (Byers y Kramer, 2010).

2.1.2.6 Basófilos

Los basófilos son células mononucleares con un alto contenido granular su diferenciación está mediada por IL-3, contienen histamina y comparten muchas similitudes con los mastocitos residentes en los tejidos, activándose cuando se produce entrecruzamiento del antígeno con el receptor FcεRI de IgE. El entrecruzamiento provoca la rápida degranulación y liberación del contenido intracelular. Los basófilos también pueden activarse sin la presencia de IgE, gracias a mediadores inflamatorios como los factores del complemento (C5a y C3a), MBP, PAF y quimiocinas. En ovejas y caprinos se observan con poca frecuencia presencia de basófilos en sangre periférica, cuando se observan contienen numerosos, pequeños y electrodensos gránulos citoplasmáticos; que pueden enmascarar completamente el núcleo (Figura 2 y 5) estos datos concuerdan con lo reportado por Anosa (1993) y Harvey (1998).

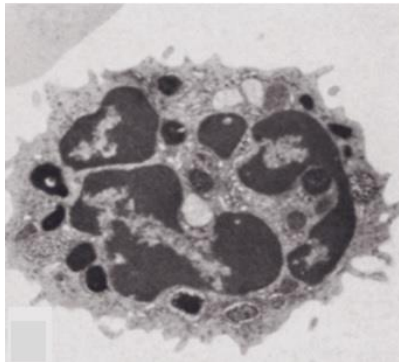


Figura 5. Imagen de un Basófilo de oveja con diversa población de gránulos citoplasmáticos. Amplificación 13,000x. (Byers y Kramer, 2010).

2.1.2.7 Monocitos

Los monocitos, son los precursores circulantes de macrófagos tisulares, el primer precursor reconocible de monocitos es el monoblasto, seguido del promonocito, con gránulos citoplasmáticos y núcleo mellado. En promedio de 6 días el monocito maduro es más grande que un neutrófilo, tiene citoplasma lleno de gránulos con enzimas hidrolíticas, además de conservar capacidad limitada de dividirse, así como sufrir una diferenciación adicional al entrar en los tejidos, donde pueden vivir semanas o meses (Byers y Kramer, 2010).

Los monocitos de ovejas y caprinos pueden ser redondos o convolucionados, con diámetro de 13- 19 μm (Anosa, 1993; Harvey, 1998); el núcleo puede ser mellado o bilobulado, y contiene patrón difuso de cromatina, el citoplasma es gris y contiene gránulos pequeños, indistintos, de magenta a eosinófila cuando está manchado con la tinción de Wright; las vacuolas citoplasmáticas

son comunes y de forma más irregular que los que se ven en algunos linfocitos grandes (Figura 6).

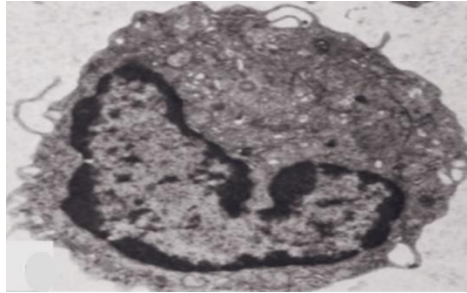


Figura 6. Imagen de un monocito de oveja con gránulos, vesículas, ribosomas, el retículo endoplasmático rugoso, la mitocondria y los cuerpos de Golgi son destacados. Amplificación 13,000x. (Byers y Kramer, 2010).

2.1.3 Proceso inflamatorio como respuesta inmune

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico ante infección o lesión por invasores extraños; virus y bacterias, las cuales desencadenan que diversos glóbulos blancos se transporten por el torrente sanguíneo hasta el lugar de invasión o infección. Durante este momento el organismo puede presentar síntomas de: dolor, enrojecimiento, aumento de la temperatura o edema, así como rigidez o pérdida de movilidad. En humanos se ha observado que la fiebre ayuda a acelerar el metabolismo, por cada cuatro grados centígrados que sube la temperatura las reacciones químicas se multiplican por dos, entre los procesos que son favorecidos están mecanismos relacionados con eliminación de toxinas; por lo que se considera la inflamación un proceso de desintoxicación del organismo y de limpieza (Lee *et al.*, 2000).

El proceso inflamatorio desencadena la activación del complemento generando C3-convertasa, de acción proteolítica sobre el factor C3 (componente complemento), fragmentándola en C3a (anafilotoxina) y C3b; la unión de C3b sobre la membrana en cuestión es elemento fundamental para el proceso de opsonización (proceso de marcaje) por fagocitos. El quimioattractor de neutrófilos y el activador C5a también se produce, y junto con C3a y C4a desencadena el lanzamiento de histamina por desgranulación de mastocitos. Esto a su vez causa la contracción de los músculos lisos y rápido aumento en la permeabilidad vascular local (Lasky, 1995).

A medida que el neutrófilo se activa, rápidamente arroja L-selectina de su superficie y la reemplaza con otras moléculas de adhesión de superficie celular, como integrinas, quienes se unen E-selectina, que aparece en la pared de los vasos sanguíneos bajo la influencia de

mediadores inflamatorios como lipopolisacárido de la pared celular de bacterias, citoquinas IL-1, TNF, complemento de prostaglandinas, leucotrienos y otros mediadores inflamatorios que contribuyen a la concentración de células inflamatorias como citosinas quimiotácticas llamadas quimiocinas. Los neutrófilos activados pasan a través de paredes del vaso, moviéndose hacia arriba en el gradiente quimiotáctico para acumularse en el sitio de infección, donde están colocado para fagocitar cualquier microbio recubierto de C3b (Arnaout y Michishita, 1993).

El organismo está preparado para producir inflamación en el momento que se considera necesario, pero también puede reducirla o calmarla. Las prostaglandinas pueden controlar procesos inflamatorios, afectar el tono muscular de arterias, disminuir la presión sanguínea o reducir el agregamiento plaquetario, un grupo de ellas presentan efectos opuestos por lo que existe un delicado equilibrio entre estos efectos, el cual determina el estado de salud. Las prostaglandinas se producen a partir de ácidos grasos esenciales presentes en los alimentos, razón por la cual la dieta consumida puede ser de importancia en la respuesta inflamatoria (Barrera *et al.*, 2000; Guerin *et al.*, 2001).

Las prostaglandinas reguladoras de inflamación son necesarias ya que la inflamación es un proceso del organismo para eliminar sustancias de desecho, entre ellos radicales libres, pero una vez iniciado el proceso es importante haya la menor cantidad de estas prostaglandinas para que la inflamación sece. En el proceso inflamatorio intervienen algunas vitaminas y minerales: las vitaminas de intervención pueden ser la vitamina C, E, B3 y B6; los minerales zinc y selenio (Lee *et al.*, 2000).

2.2 Acción del selenio en la inmunidad

La participación del selenio dentro del organismo es la de fortalecer al sistema inmunitario y reducir la inflamación mediante la enzima glutatión peroxidasa dependiente de selenio, que participa en el proceso de eliminación de especies reactivas de oxígeno catalizando la reducción de los peróxidos (H₂O₂) y lipoperóxidos, específicamente durante la gestación normal (Reyna *et al.*, 2002), observando incremento de antioxidantes en sangre conforme progresa la gestación. En caso de que la concentración de selenio-Glutatión peroxidasa sea baja se favorece la formación de moléculas oxidativas lo que puede ocasionar gestación complicada. Al comparar la concentración de radicales libres entre mujeres con preeclampsia y mujeres sin ésta, las primeras presentan incremento de radicales libres. Se considera que administrar selenio a hembras

gestantes o próximas a inseminación puede favorecer la eliminación de radicales libres al estimular la producción de glutatión peroxidasa dependiente de dicho mineral permitiendo así tener homeostasis en estos productos (Rusterholz *et al.*, 2007).

2.3 Acción del selenio en la inmunidad

La participación del selenio dentro del organismo es la de fortalecer al sistema inmunitario y reducir la inflamación mediante la enzima glutatión peroxidasa dependiente de selenio, que participa en el proceso de eliminación de especies reactivas de oxígeno catalizando la reducción de los peróxidos (H₂O₂) y lipoperóxidos, específicamente durante la gestación normal (Reyna *et al.*, 2002), observando incremento de antioxidantes en sangre conforme progresa la gestación. En caso de que la concentración del binomio selenio-Glutatión peroxidasa sea baja se favorece la formación de moléculas oxidativas lo que puede ocasionar gestación complicada. Al comparar la concentración de radicales libres entre mujeres con preeclampsia y mujeres sin ésta, las primeras presentan incremento de radicales libres. Se considera que administrar selenio a hembras gestantes o próximas a inseminación puede favorecer la eliminación de radicales libres al estimular la producción de glutatión peroxidasa dependiente de dicho mineral permitiendo así tener homeostasis en estos productos (Rusterholz *et al.*, 2007).

2.4 El selenio y su importancia en la reproducción

Durante muchos años el selenio fue asociado a diversos problemas de intoxicación más que con deficiencias, tiempo después se demostró su esencialidad e incluso la necesidad de aportarlo en la dieta de los animales de interés zootécnico debido a las diversas funciones que desempeña en el organismo. Algunos de los síntomas asociados a la deficiencia de selenio son; caída de lana o pelo, agrietamiento de cascos o pesuñas, así como la manifestación de la enfermedad del musculo blanco, disminución de ganancia de peso y por tanto deterioro de la condición corporal (Crempien, 1988).

Años más tarde diversos estudios demostraron que el selenio es un micromineral de importancia biológica, desempeña funciones en el crecimiento, reproducción y prevención de enfermedades, además de participar en protección e integridad de membranas celulares (McDowell, 2003). Las funciones más importantes se debe a las selenoproteínas, conjunto de proteínas, que poseen los aminoácidos selenocisteína y selenometionina, análogos a la cisteína y metionina respectivamente, las cuales contienen selenio en lugar de azufre. La selenocisteína es

incorporada a la síntesis ribosomal de proteínas mediante un mecanismo específico, montado sobre el aparato traduccional canónico, que permite la decodificación de codones UGA como selenocisteína (aminoácido involucrado en la catálisis redox). El selenoproteoma del ser humano consta de 25 proteínas, aun se desconoce la función de todas ellas, pero se siguen estudiando (Guerin *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2005).

Las selenoproteínas son importantes en el mantenimiento de la homeostasis redox, debido a los sistemas de tiorredoxina y glutatión, y también guardan importancia en el metabolismo de las hormonas tiroideas utilizando a tironina deiodinasa, en la maduración de los espermatozoides y en la función muscular por acción de la selenoproteína N (Álvarez *et al.*, 2010), además de participar en la síntesis de ADN, en mecanismos de inmunidad y reproductivos, su adición en la dieta mejora la fertilidad tanto en hembras como en machos, en hembras, específicamente en mejorar la viabilidad del oocito y células de la granulosa (Vázquez *et al.*, 2017), efecto que se expresa en la sanidad del folículo maduro y por supuesto en la producción de progesterona ya que ayuda a alargar el tiempo de vida del cuerpo luteo (CL) y es indispensable en el proceso de implantación del blastocito y mantenimiento de la gestación. La deficiencia de selenio esta asociado a aumento en muertes embrionarias, de mortalidad neonatal, al igual que con nacimiento de corderos débiles o muertos y retención de placenta (Tomac, 2011); mientras que en machos se afecta la espermatogénesis.

Otro estudio realizado por Surai *et al.* (1998) sobre la función que desempeña el selenio a nivel celular, demuestran que este oligoelemento esencial participa en la protección de membranas celulares ante degeneración oxidativa a causa de los radicales libres productos de múltiples reacciones metabólicas dentro del organismo por lo que la falta de este micronutriente ocasiona la degradación y degeneración de los tejidos.

2.5 Estrés oxidativo

2.5.1 Radicales libres

Las especies de radicales libres son inestables y altamente reactivas, para estabilizarse deben adquirir electrones provenientes de ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, carbohidratos o cualquier molécula cercana, causando una cascada de reacciones en cadena que resulta en daño celular y enfermedad (Attaran *et al.*, 2000; Pierce *et al.*, 2004). Existen dos principales tipos de

especies de radicales libres: especies de oxígeno reactivo (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (NOS).

2.5.2 Especies de oxígeno reactivo

Existen tres tipos principales de ROS: superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroxilo (OH^{\bullet}) y el radical superóxido el cual se forma cuando los electrones se escapan de la cadena transportadora de electrones (Halliwell *et al.*, 1992). La dismutación del superóxido da como resultado la formación de peróxido de hidrógeno, el ion hidroxilo es altamente reactivo y puede modificar las purinas y pirimidinas causando roturas de cadena de ADN (Mello *et al.*, 1984). Las ROS tienen diversas funciones fisiológicas y patológicas en el tracto reproductivo femenino. Se han realizado múltiples estudios en animales y humanos demostrando la presencia de ROS en el tracto reproductivo femenino: ovarios (Jozwik *et al.*, 1999; Behrman *et al.*, 2001) trompas de Falopio (Mouatassim *et al.*, 1999) y embriones (Guerin *et al.*, 2001), dando pauta para afirmar que ROS están involucradas en la modulación de numerosas funciones fisiológicas reproductivas como son la maduración de los ovocitos, la esteroidogénesis en el ovario, función del CL y luteolisis, así como en el metabolismo del embrión y de su entorno (Ishikawa *et al.*, 1993; Sabatini *et al.*, 1999; Behrman *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 2017).

2.5.3 Especies reactivas de nitrógeno

El óxido nítrico (NO) se sintetiza durante la conversión de la enzima L-arginina a L-citrulina por acción de óxido nítrico sintasa (NOS) (Rosselli *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998) quedando con un electrón desapareado, NO, que es un radical libre altamente reactivo, daña proteínas, carbohidratos, nucleótidos y lípidos resultando en daño celular total y en tejidos (Dong *et al.*, 2001). NO relaja la sangre arterial y venosa, también puede inhibir la agregación plaquetaria y adhesión, actuando como agentes vasodilatadores (Ohl *et al.*, 2002).

La NOS se asocia con asma, lesión isquémica/reperfusión, choque séptico y aterosclerosis (Schrier *et al.*, 2004; Reynaert *et al.*, 2005). Las especies reactivas de nitrógeno más comunes son el óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (Attaran *et al.*, 2000; Pierce *et al.*, 2004). El NO es producido por la enzima NO-sintasa, es importante mencionar que existen tres tipos de óxido nítrico sintasa (NOS) isoenzimas en mamíferos que implican la NOS endotelial (eNOS), NO sintasa neuronal (nNOS) y NO sintasa inducible (iNOS). Tanto la nNOS y la eNOS son sintasas

constitutivas de NO, responsables de la liberación basal continua inducible de NO; por otro lado, iNOS está presente en fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos) y produce gran cantidad de NO como respuesta al proceso proinflamatorio de citoquinas y lipopolisacáridos (Ota *et al.*, 1998; Rosselli *et al.*, 1998; Osborn *et al.*, 2002). La eNOS se expresa en células tecaes, células de la granulosa y la superficie del ovocito durante el desarrollo folicular, en la mayoría de los órganos, la iNOS es expresada solo en respuesta a estímulos inmunológicos (Lee *et al.*, 2000).

2.6 Antioxidantes en el organismo y su relación con el daño celular

2.6.1 Antioxidantes

En condiciones normales, se conocen moléculas de "barrido" como antioxidantes los cuales convierten ROS en H₂O para evitar la sobreproducción de ROS y mantener la homeostasis dentro del organismo. Hay dos tipos de antioxidantes en el cuerpo humano: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Van Langendonck *et al.*, 2002; Pierce *et al.*, 2004).

2.6.2 Antioxidantes enzimáticos

Se conocen como antioxidantes naturales, neutralizan ROS excesivos, evitando daño celular estructural, dentro de este grupo se encuentran: SOD, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, que causa la reducción de peróxido de hidrógeno a agua y alcohol (Van Langendonck *et al.*, 2002).

2.6.3 Antioxidantes no enzimáticos

También conocidos como antioxidantes sintéticos o suplementos dietéticos. El complejo sistema antioxidante del organismo está influenciado por la ingesta de antioxidante vitaminas y minerales como vitamina C, vitamina E, selenio, zinc, taurina, hipotaurina, glutatión, beta caroteno y caroteno (Van Langendonck *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2003; Pierce *et al.*, 2004). La vitamina C es cofactor enzimático implicado en diversas reacciones fisiológicas (hidroxilación) como síntesis del colágeno y glóbulos rojos, contribuye al buen funcionamiento del sistema inmunitario pues detiene propagación del proceso peroxidativo, además la vitamina C ayuda a reciclar vitamina E y glutatión oxidado (Chan, 1993). Por otro lado la taurina, hipotaurina y transferrina se encuentran principalmente en la trompa y líquido folicular donde protegen al embrión del estrés oxidativo (Guerin *et al.*, 2001). La glutatión está presente en el

líquido ovocito y tubárico, donde tiene como acción mejorar el desarrollo del huevo o embrión (de Matos y Furnus, 2000).

2.7 Relación del estrés oxidativo en la reproducción

Las células han desarrollado amplia gama de sistemas antioxidantes capaces de limitar la producción de ROS, inactivarlas y reparación de daño celular (Van Langendonck *et al.*, 2002; Agarwal y Allamaneni, 2004; Pierce *et al.*, 2004) el estrés oxidativo influye en toda la vida reproductiva de mujeres e incluye el periodo de menopausia, se ha propuesto que el declive en fertilidad producido por la edad es modulada por el estrés oxidativo (OS) (de Bruin *et al.*, 2002) otros eventos reproductivos modulados por presencia de antioxidantes son: gestación (Myatt y Cui, 2004), parto normal (Fainaru *et al.*, 2002; Mocatta *et al.*, 2004), así como trabajo de parto y partos prematuro (Wall *et al.*, 2002; Pressman *et al.*, 2003). Otros estudios han demostrado que las ROS afectan otras funciones reproductivas como son la maduración de oocitos, esteroidogénesis ovárica, ovulación, implantación, formación de blastocisto, luteolisis y mantenimiento lúteo en gestación (Ishikawa, 1993; Vega *et al.*, 1998; Jozwik *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999; Sugino *et al.*, 2000) debido a que ROS sirven como señal clave a moléculas en procesos fisiológicos y patológicos; concentraciones altas de ROS producen enfermedades en órganos reproductivos como endometriosis y patogénesis de la infertilidad femenina afectando la fertilización e implantación de cigotos (Bedaiwy *et al.*, 2002; Agarwal y Allamaneni, 2004; Sharma y Agarwal, 2004).

En células de granulosa y teca del folículo en crecimiento se han encontrado enzimas dependientes de cobre, zinc y manganeso como: SOD, por otro lado la glutatión peroxidasa dependiente de selenio tiene actividad en el líquido y suero folicular de pacientes sometidos a fecundación in vitro. En oviductos y ovocitos de humano y ratón se ha visto expresión de las enzimas antioxidantes tales como SOD, glutatión peroxidasa y gamma-glutamylcisteína sintetasa; que ayudan a mejorar la calidad tanto del óvulo como del folículo por atrapamiento de ROS (Mouatassim *et al.*, 1999). El estrés oxidativo influye en el desarrollo embrionario temprano al modificar factores clave de transcripción y por lo tanto la expresión génica (Dennerly, 2004).

2.8 Presencia de radicales libres en el desarrollo folicular

Diversos estudios han utilizado marcadores de estrés oxidativo como la SOD, Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, glutatión peroxidasa dependiente de selenio, γ glutamil sintetasa y peróxidos lipídicos; localización realizada con inmunohistoquímica, expresión de m-ARN y tiobarbitúrico método ácido (Suzuki *et al.*, 1999; Attaran *et al.*, 2000; Sugino *et al.*, 2000); estas técnicas muestran la expresión de varios biomarcadores de estrés oxidativo para que se lleve a cabo el ciclo normal del desarrollo folicular en ovarios de humanos (Shiotani *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1999); se han estudiado todas las etapas foliculares; para localización de expresión de SOD (Suzuki *et al.*, 1999), demostrando que las ROS tiene función reguladora en la maduración de ovocitos, foliculogénesis, esteroidogénesis ovárica y luteolisis, por lo que existe delicado equilibrio entre ROS y las enzimas antioxidantes en tejidos ováricos, debido a que las enzimas antioxidantes neutralizan la producción de ROS y protegen al ovocito y embrión, además otra investigación realizada por Shiotani *et al.* (1991) demostró presencia de SOD en las células de teca interna de folículos antrales ováricos

Investigaciones realizadas por Suzuki *et al.* (1999) que investigaron la unión del anticuerpo a la proteína Ad4 (Ad4BP) para localizar Ad4BP en núcleos de células de teca y granulosa; Ad4BP es un factor de transcripción esteroidogénico que induce transcripción de la enzima P450 esteroidogénica que controla la esteroidogénesis ovárica, se encontró correlación entre expresión de Ad4BP y SOD lo que indica asociación entre estrés oxidativo y esteroidogénesis ovarica. Tanto las células de granulosa como luteas de humano responden al peróxido de hidrógeno con supresión de la acción de gonadotropina e inhibición de secreción de progesterona (Behrman *et al.*, 2001). La producción de progesterona y estradiol es reducida cuando se agrega peróxido de hidrógeno a cultivo de células lúteas estimuladas por gonadotropina coriónicas humanas, el peróxido de hidrógeno disminuye la esteroidogenesis tanto dependiente del AMP cíclico como la no dependiente de cAMP (Vega *et al.*, 1995).

La función de gonadotropina coriónica humana (hCG) en la expresión lutea de las enzimas SOD y Cu-Zn-SOD en paralelo con progesterona fue investigada en pacientes con histerectomía y cirugía para gestación ectópica y estos niveles se elevaron desde la fase lutea temprana a la media y disminuyeron durante la regresión del CL. Sin embargo, en pacientes embarazadas la expresión de ARNm para Cu-Zn SOD en CL fue mayor que en cuerpo lúteo de medio ciclo, esta expresión potenciada de superoxico dismutasa dependiente de Cu-Zn luteal se debe a hCG,

concluyendo que hCG tiene función en el mantenimiento de la función del CL en la gestación (Vega *et al.*, 1995).

Investigación realizada por Jozwik *et al.* (1999) sobre el estrés oxidativo, dienos conjugados, hidroperóxido de lípidos y ácido tiobarabítúrico se determinaron en folículos preovulatorios encontrando que existía gradiente de concentración significativamente menor en el líquido folicular en comparación con niveles séricos; el folículo preovulatorio tiene potente sistema de defensa antioxidante, que se agota por la peroxidación intensa. La glutatión peroxidasa también puede mantener bajos niveles de hidroperóxidos dentro del folículo y por lo tanto, tiene acción importante en gametogénesis y la fertilización (Paszkowski *et al.*, 1995).

2.9 Ovulación

La producción de un ovocito viable está modulada por interacción compleja de factores endocrinos, paracrinos y autocrinos que conducen a la maduración folicular, ovulación y luteinización. Muchos factores hormonales y paracrinos determinan la competencia de oocitos y calidad embrionaria. Hormonas esteroideas, autocrino local y los factores paracrinos influyen en las células del estroma ovárico, las gonadotropinas actúan a través de múltiples vías de señalización locales, donde el AMP cíclico es el segundo mensajero para provocar el efecto de la hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante (LaPolt *et al.*, 2003), el AMP cíclico también activa otras vías de señalización. El monofosfato de guanósina cíclico (cGMP), nucleótido cíclico, se ha propuesto como vía de segundo mensajero, donde los efectos de NO son mediados por cGMP o como resultado de la generación de ROS de la interacción de NO con los radicales superóxido (Hanafy *et al.*, 2001).

Considerando que tanto neuronas, vasos sanguíneos y células del sistema inmune son partes integrales de los órganos reproductivos, existe probabilidad que NO sea importante regulador de la biología y fisiología del sistema reproductivo (Rosselli *et al.*, 1998).

2.10 Integridad del cuerpo lúteo y producción de progesterona

En los mamíferos la función del cuerpo lúteo (CL) es la síntesis de progesterona (P4) requerida para el establecimiento del ambiente uterino idóneo para el desarrollo de peri-implantación (embriones y membranas extra embrionarias asociadas) y del éxito del mantenimiento de la gestación (Ryan, 1969). La progesterona actúa en el endometrio para

regular la síntesis de factores de crecimiento, citoquinas, en la adhesión y transporte de proteínas, inhibidores de proteasas, hormonas y enzimas que son reguladores primarios de la implantación, supervivencia y desarrollo de la gestación (Graham y Clarke, 1997). Así, la producción comprometida de progesterona por el CL es factor de riesgo potencial para el desarrollo prenatal y el éxito de la gestación (Arredondo y Noble, 2006; Diskin y Morris, 2008).

La regresión o desaparición del CL permite el inicio de un nuevo ciclo reproductivo, en cada ciclo no fértil se caracteriza por la pérdida de capacidad de las células lúteas para producir y secretar progesterona (regresión funcional) así como muerte de células lúteas (regresión estructural). El CL funcional de mamífero contiene dos tipos de células esteroidogénicas, denominadas células lúteas grandes y pequeñas, las cuales se establecen entre el tejido conectivo y la vasculatura abundante (Kato *et al.*, 1997; Tomac, 2011).

Los mecanismos de rescate del CL de la muerte celular y el mantenimiento de la producción de progesterona son muy complejos y varían entre las especies de mamíferos (Niswender *et al.*, 2000). Behrman *et al.* (2001) encontraron evidencia sustancial de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son factores clave para determinar el tiempo de vida del CL y que los antioxidantes son importantes en la fisiología de este; durante el ciclo estral (Sugino *et al.*, 2000a, Al-Gubory *et al.*, 2005, 2006; Sugino *et al.*, 2006,). La producción y propagación de ROS luteal depende de diversos factores reguladores, como antioxidantes lúteos, hormonas esteroides, y citoquinas. Sin embargo, se desconoce cuál de estos factores tienen mayor contribución a la función del CL.

Existen estudios *in vivo* que estudian el CL entre los más destacados están los realizados en ratas (Sugino *et al.*, 1993a), mujeres (Sugino *et al.*, 2000a) y ovejas (Al-Gubory *et al.*, 2004; Arianmanesh *et al.*, 2011) que han demostrado la importancia de enzimas antioxidantes en el control de la función luteal durante el período de peri implantación, aunque aún no está clara la secuencia de eventos que conducen a la regresión lútea funcional y estructural al final del ciclo estral/menstrual, como defecto de la fase lútea se puede afectar la fertilidad al impedir la implantación y el desarrollo embrionario temprano en animales y humanos.

2.11 Acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la esteroidogénesis del CL

Como toda célula aeróbica, las células del CL producen ATP a través de la respiración de O₂ teniendo como subproducto la formación de ROS luteales. El paso limitante de la esteroidogénesis en todos órganos esteroidogénicos, incluido el CL (Christenson y Devoto, 2003), es la transferencia de colesterol desde el exterior a la membrana mitocondrial interna donde se convierte en pregnenolona por la enzima citocromo P450 luteal (ROS se generan a través de rutas enzimáticas del citocromo P450 mitocondrial; Zangar *et al.*, 2004). En el CL los ROS son producidos por macrófagos (Sugino *et al.*, 1996) y células lúteas (Kato *et al.*, 1997) y con su presencia afectan la producción de progesterona.

Estudios realizados por Laloraya *et al.* (1988) reportan que ROS regular la biosíntesis de la hormona esteroidea en el CL. La inducción de SOD ovárico por LH, que a su vez podría conducir a la producción de H₂O₂, sugiere que esta acción está involucrada en el mecanismo por el cual la LH estimula la secreción de progesterona en el CL de la rata mostrando que ROS puede funcionar beneficiosamente para controlar la producción de progesterona por células lúteas durante el ciclo reproductivo pero que también inhibe la síntesis de progesterona al final del ciclo (Carlson *et al.*, 1993). Se ha informado que los aniones superóxido O₂⁻ está involucrado en el mecanismo por el cual LH estimula secreción de progesterona en el CL de la rata (Sawada y Carlson, 1996).

Ho *et al.* (1998) informaron por primera vez que la deficiencia de SOD1 conducía a baja fertilidad debido a pérdida embrionaria posterior a la implantación en ratones hembra. Un estudio reciente demuestra que el aumento de O₂ ovárico intracelular en ratonas con deficiencia de SOD1 se asocia con aumento de muerte celular apoptótica en el CL y en la alteración de la formación de CL y producción de progesterona (Noda *et al.*, 2012). Estos datos indican que el control de O₂ por SOD1 en el ovario es fundamental para el mantenimiento de la función luteal y secreción de progesterona. La generación controlada de ROS por antioxidantes es uno de los elementos centrales en los mecanismos implicados en la función celular, crecimiento, diferenciación y muerte (Valko *et al.*, 2007), por lo tanto, se presume que ROS puede funcionar como reguladores intracelulares de la esteroidogénesis y que mantener el equilibrio entre la capacidad antioxidante luteal y la producción de ROS es crucial para la integridad y la función de CL.

La generación de ROS sin control conduce a la alteración irreversible de biomacromoléculas que incluyen: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, en última instancia causa disfunción mitocondrial, liberación de ROS inducida por ROS mitocondrial y muerte celular por apoptosis (Zorov *et al.*, 2006).

La muerte de células luteales apoptótica es un proceso complejo que involucra cambios *in situ* de ROS, producción de hormonas esteroides, presencia de células inmunitarias y expresión de citoquinas (Kato *et al.*, 1997; Pate y Landis Keyes, 2001). De acuerdo con Banyer *et al.* (2000) diferentes tipos de citoquinas son secretadas por distintas células inmunes que interactúan con esteroidogénesis, que influye en el desarrollo y la función de CL. Las especies mamíferas tienen diversos mecanismos apoptóticos para controlar la función lútea (Sugino y Okuda, 2007), la evidencia indica que la apoptosis inducida por ROS es de fundamental importancia para determinar la vida activa de CL (Kato *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2000; Behrman *et al.*, 2001; Garrel *et al.*, 2007).

Investigaciones realizadas *in vivo* muestran que la progesterona promueve supervivencia de células lúteas en varias especies, esto incluye: inducción de apoptosis relacionada con disminución rápida en producción de progesterona lútea en ganado (Juengel *et al.*, 1993), humanos (Shikone *et al.*, 1996; Sugino *et al.*, 2000b), hamsters (McCormack *et al.*, 1998), ratas (Bruce *et al.*, 2001) y ovejas (Al-Gubory *et al.*, 2005). Inhibición de la secreción de progesterona luteínica (Garrel *et al.*, 2007) antecede a la fragmentación del ADN y la muerte celular del CL de la oveja. La inhibición de la síntesis de progesterona por la producción incontrolada de ROS lútea puede ser una vía clave involucrada en la desaparición del CL al final del ciclo menstrual.

El CL de mamíferos incluidos los humanos (Shutt *et al.*, 1975), ratas (Elbaum y Keyes, 1976), cerdos (Gregoraszcuk y Oblonczyk, 1996) y ganado (Okuda *et al.*, 2001). Produce otra hormona esteroide que es el estradiol, el estradiol lúteo puede tener función paracrina y/o regulador autocrino de la función CL durante el ciclo menstrual. El estradiol luteal se cree que es luteotrópico en roedores (Stocco *et al.*, 2007), esta hormona mejora el suministro de colesterol al estimular la absorción de este en la circulación y movilización intracelular. Sin embargo, hay evidencia para indicar que el estradiol puede inducir la muerte de células lúteas estimulando la ruta de síntesis de NO o dióxido de nitrógeno/óxido nítrico (NO₂) y eventualmente otras vías luteolíticas. El NO actúa como regulador de señalización de muchos

procesos fisiológicos incluyendo la esteroidogénesis ovárica, además de que el NO interactúa con las enzimas que contienen hierro, como enzimas del citocromo P450 e inhibe la síntesis del estradiol ovárico (Wink *et al.*, 1993; Stadler *et al.*, 1994). La estimulación de NO inhibe la actividad de la aromatasas y la secreción de estradiol, mientras que la inhibición de NOS endógena mejora la secreción del estradiol en humanos (Van Voorhis *et al.*, 1994), rata (Olson *et al.*, 1996) y porcino en células de granulosa (Masuda *et al.*, 1997).

El ácido araquidónico liberado de la hidrólisis de los fosfolípidos de membranas por parte de las fosfolipasas A2 (PLA2) puede utilizarse como sustrato para la síntesis de prostaglandinas (PG), incluyendo la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Se ha propuesto que la PGF_{2α} luteal actúa a través de un mecanismo paracrino y/o autocrino para inducir luteólisis en diversas especies como son primates no humanos, mujeres, cerdas, ovejas, ganado y roedores (Auletta y Flint, 1988).

La regresión de CL se considera un proceso isquémico e implica activación O₂ y H₂O₂ mediada por PLA2 (Wu *et al.*, 1992). Las citoquinas producidas localmente pueden ser de importancia en la función luteal y regresión estructural por activación de la generación de ROS y PGF_{2α} lútea. El reclutamiento de células inmunes de circulación sistémica y su infiltración en el CL así como la expresión de citoquinas proinflamatorias aumenta el tiempo de luteolisis (Pate y Landis Keyes, 2001). Diversas investigaciones indican que la PGF_{2α} está implicada en la regresión lútea a través de la generación de O₂ (Sawada y Carlson, 1991; Aten *et al.*, 1998); la generación de H₂O₂ inducida por PGF_{2α} se ha sugerido como mediador clave de la acumulación de leucocitos durante la regresión CL (Minegishi *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la PGF_{2α} disminuye la expresión de proteínas secuestrantes de ROS y por lo tanto facilitar la acumulación de ROS, desencadenando una cascada de eventos que causan muerte de células lúteas en el CL del ratón durante la regresión lútea (Foyouzi *et al.*, 2005) siendo así la PGF_{2α} un regulador esencial de la regresión funcional y muerte celular por apoptosis (Arosh *et al.*, 2004; Al-Gubory, 2005; Garrel *et al.*, 2007; Kurusu *et al.*, 2007).

El radical libre NO tiene acción anti esteroidogénica en humano (Vega *et al.*, 1998), conejo (Gobbetti *et al.*, 1999) y bovinos (Skarzynski y Okuda, 2000), NO es mediador de la peroxidación lipídica inducida en CL de rata por PGF_{2α} durante la luteolisis relacionada con inhibición de la producción de progesterona (Motta *et al.*, 2001), el NO al tener interacción con componentes de la cadena de transporte de electrones puede mejorar la generación mitocondrial de ROS y desencadenar mecanismos de supervivencia celular o apoptosis (Moncada y

Erusalimsky, 2002) siendo el radical O_2 precursor de la mayoría de ROS, incluido H_2O_2 y OH, y podría ser mediador en la cadena oxidativa de reacciones y muerte celular por apoptosis.

2.12 Función de las enzimas antioxidantes en el cuerpo lúteo para el establecimiento de la gestación

El estudio realizado por Sugino *et al.* (1999) mencionan que las enzimas antioxidantes protegen a células lúteas contra la oxidación, daño y apoptosis influida por ROS, además, la inhibición de la actividad de SOD1 por oligonucleótido antisentido induce la regresión lútea funcional del CL de rata, esta evidencia apunta que los antioxidantes desempeñan actividad de limpieza importante ante ROS para rescatar al CL de luteolisis cuando se produce la gestación en diferentes especies de mamíferos.

Durante gestación temprana, se encuentran altas concentraciones de SOD en ovarios de ratón (Laloraya *et al.*, 1989), mientras que en ratas hay aumento en actividad de SOD1 y SOD2 (Sugino *et al.*, 1993a), en bovino aumenta la expresión de SOD2 y CAT (Rueda *et al.*, 1995), en CL de humano hay alta expresión y actividad de SOD1 (Sugino *et al.*, 2000a), y en CL de oveja se incrementa la actividad de SOD1, GPX y GST (Al-Gubory *et al.*, 2004) y la expresión de proteína GSTA1 (Arianmanesh *et al.*, 2011) estas actividades y expresiones en conjunto son evidencias que apoyan esta hipótesis.

La capacidad de SOD1 y CAT para estimular la secreción de progesterona *in vivo* por CL de rata (Sugino *et al.*, 1993b) y la presencia de proteína SOD1 en CL de oveja en la primera mitad de la gestación (Al-Gubory *et al.*, 2003) sugieren que las enzimas antioxidantes eliminadoras de ROS desempeñan acción reguladora de la función lútea durante la gestación. Concentraciones mantenidas de SOD1, SOD2, GPX, GSR y GST en CL de oveja durante toda la gestación se puede relacionar a ROS luteales y puede estar involucrado en el mantenimiento de actividad luteal esteroidogénica, así como a la integridad celular (Al-Gubory *et al.*, 2004).

La producción descontrolada de ROS tiene impacto en la implantación y desarrollo prenatal del embrión, tanto en humanos como en animales domésticos (Agarwal *et al.*, 2008; Al-Gubory *et al.*, 2010).

2.13 Función de ROS durante la fecundación, implantación y sobrevivencia embrionaria

Durante los últimos años se han realizado diversas investigaciones sobre la producción de ROS, y si estas afectan; la fecundación, implantación, sobrevivencia embrionaria, desarrollo y mantenimiento de la gestación, encontrando que bajos niveles de NO son importantes en la función ovárica, implantación y relajación de la musculatura del oviducto (Ekerhovd *et al.*, 1997), y que altos niveles de NO; son nocivos sobre la motilidad de espermatozoides, tóxicos para los embriones e inhiben la implantación (Oztezcan *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004) además de ser biorregulador en la apoptosis (Chung *et al.*, 2001) trayendo como consecuencia la activación de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que contribuyen a elevar la producción de ROS (Zeller *et al.*, 1987) y por tanto existe mayor liberación de citosinas y otros mediadores inmunes, como el mismo NO implicado en la inflamación de bajo grado.

Altos niveles de NO, como los producidos por macrófagos, influyen negativamente en la fertilidad de varias maneras: ocasionan cambios en líquido peritoneal necesario para lubricar las cavidades abdominal y pelviana; alterando el proceso de ovulación esto debido a que al romperse el folículo y liberar el óvulo, estas dos entidades pueden no contar con el medio de lubricación y conducción propia que favorezca el desplazamiento del óvulo hasta la trompa de Falopio que se encuentra preparada para recibirlo y propiciar su encuentro con el espermatozoide, por esto cambios (aumento) en la concentración de células fagocíticas y productoras de radicales libres en líquido peritoneal afectan tanto transporte de gametos, interacción del ovocito con el espermatozoide, fertilización y con ello el desarrollo embrionario temprano (Dong *et al.*, 2001; Polak *et al.*, 2001; Szczepanska *et al.*, 2003). Por otro lado el aumento de óxido nítrico ocasiona hiperperistalsis uterina y disperistalsis que también altera el transporte de espermatozoide y reduce la fertilidad (Leyendecker *et al.*, 1996).

Diversas citoquinas secretadas por las células endometriales, inmunes o macrófagos estimulan la NO endotelial sintasa para liberar NO (Ota *et al.*, 1998; Ota *et al.*, 1999; Van Langendonck *et al.*, 2002) ocasionando respuestas inmunes anormales que estimulan a los macrófagos y/o células endometriales para producir cantidad persistentemente de NO e inhibir la implantación (Abrahams *et al.*, 2004).

Niveles fisiológicos de redox son importantes para la embriogénesis ya que la sobreproducción de ROS es nociva para el embrión y el feto como resultado de deterioro del

medio intracelular y metabolismo perturbado debido a producción del anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. El estrés oxidativo puede ser generado en espermatozoides, leucocitos y la activación de los ovocitos mediada por espermatozoides y la activación del genoma embrionario (Guerin *et al.*, 2001; Harvey *et al.*, 2002).

La generación ROS resulta de la fosforilación oxidativa mitocondrial; los electrones se escapan de la cadena de transporte de electrones en las membranas mitocondriales internas, se transfieren a la molécula de oxígeno, lo que resulta en un electrón desapareado en la órbita generando una molécula superóxido. Los otros puntos de generación de ROS son citoplásmicos NADPH-oxidasa, citocromo enzimas P450 y la enzima xantina oxidoreductasa. Estrés oxidativo excesivo tiene efectos dañinos en el medio celular y da como resultado crecimiento celular deteriorado en el embrión o la apoptosis que resulta en la fragmentación del embrión. Nicol *et al.* (2000) realizó un estudio en animales encontrando que la enzima G6PD (Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) protege contra el estrés oxidativo y evitar embriopatías al proteger a los embriones contra el estrés oxidativo. Esta enzima podría ser una alternativa para remediar alteraciones embrionarias producidas por estrés oxidativo.

En mamíferos el desarrollo temprano de embriones ocurre a partir de la fertilización a través de la diferenciación de los sistemas de órganos principales en ambiente con poco oxígeno (Burton *et al.*, 2003). Bajas concentraciones de oxígeno en cultivo *in vitro* de embriones porcinos disminuyó el contenido de H₂O₂ y resultó en reducida fragmentación ADN, mejorando la habilidad de desarrollo embrionario (Kitagawa *et al.*, 2004); concentraciones de oxígeno mayores al 20% se asocia a menor competencia de desarrollo, generando interés en el uso de antioxidantes, como vitamina C, E, adición en dietas de ligoelementos como selenio y zinc, entre otros para superar los efectos adversos y patológicos resultados del estrés oxidativo, ya que este conduce a la regresión lútea que deriva en falta de soporte luteal para mantener la gestación, además de que el OS daña a los ovocitos y al folículo, ovocitos y espermatozoides en la cavidad peritoneal o al embrión en las trompas de Falopio mediante desequilibrio redox (prooxidante y antioxidante) (Polak *et al.*, 2001).

La fertilización y el desarrollo embrionario *in vivo* se produce en ambiente de baja concentración de oxígeno (Szczepanska *et al.*, 2003), por lo que las técnicas de reproducción asistida evitan estas condiciones que promueven la generación de ROS y la exposición de gametos y embriones así podría mejorarse la implantación y aumentando la tasa de fertilidad

(Catt y Henman, 2000) del mismo modo se recomienda el uso de antioxidantes en medios de cultivo de embriones; y de hecho ya se utilizan con el fin de obtener mayor porcentaje de implantación y aumento de fertilidad. Comparado con aquellos donde no se añadió antioxidante alguno. Iones metálicos dan como resultado la producción de oxidantes y aumento en producción de ROS a través de la reacción de Haber-Weiss por lo que agregar aminoácidos a los medios de FIV es una opción ya que tienen propiedades antioxidantes.

Se ha observado que agregar ascorbato durante la crioconservación reduce los niveles de peróxido de hidrógeno y por tanto el estrés oxidativo en embriones de mamíferos (Lane *et al.*, 2002). Se ha observado que la vascularización folicular determina el contenido de oxígeno intrafolicular y el potencial de desarrollo del ovocito (Chui *et al.*, 1997; Van Blerkom *et al.*, 1997) y que la hipoxia intrafolicular produce trastornos cromosómicos de segregación y mosaicismo [alteración genética en un mismo individuo, coexisten dos o más poblaciones de células con distinto genotipo (dos o más líneas celulares), originadas a partir de un mismo cigoto] deletéreos en el embrión, así como su implantación (Van Blerkom *et al.*, 1997).

3 HIPÓTESIS

La fuente de selenio es determinante en la concentración de progesterona, inmunidad celular, implantación embrionaria y fertilidad en los primeros días de gestación en anestro estacional de ovejas.

4 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de dos fuentes de selenio (orgánico e inorgánico) sobre la concentración de progesterona, inmunidad celular, fertilidad e implantación embrionaria de ovejas en anestro estacional

4.1 Objetivos Específicos

- Evaluar si el aporte de selenio aumentan la concentración de progesterona durante el reconocimiento materno y la implantación embrionaria de ovejas en anestro estacional.
- Evaluar cual de las dos fuentes de selenio estimula la inmunidad basada en el conteo diferencial de glóbulos blancos y su relación con progesterona en ovejas en anestro estacional.
- Establecer cual de las dos fuentes de selenio aumenta la fertilidad e implantación embrionaria de ovejas en anestro estacional.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización

La investigación se realizó en una unidad de producción ovina ubicada en el Municipio de San Andrés Chiautla, Estado de México, localizado dentro de la porción lacustre de la cuenca hidrológica del Valle de México, geográficamente se encuentra entre las coordenadas 19°32'09" y 19°36'19" latitud norte y 98°51'40" y 98°54'38" longitud oeste. Limita: al norte con el municipio de Acolman; al sur con Texcoco; al este con Papalotla y Tepetlaoxtoc; al oeste con Chiconcuac, Atenco y Tezoyuca. El clima predominante de la región es templado semiseco con lluvias en verano, temperatura media anual que oscila entre 11°C y 19°C, con una máxima de 32°C y la mínima de 6°C (INAFED, 2010).

5.2. Manejo de los animales durante la investigación

Se utilizaron 20 ovejas cruce de diferentes razas como base genética, con peso vivo promedio de 40 ± 3.26 kg y 3.05 ± 1.02 años de edad, en condición corporal (CC) de 2.5 a 3, con base a la escala de 1 a 5. Las ovejas fueron alimentadas con dieta a base de alfalfa achicalada y rastrojo de maíz. Veinte días antes de iniciar la investigación las ovejas fueron desparasitadas (Fenbendazol al 10% laboratorios Senosiain S.A de C.V.) vía oral con dosis de 1 mL por 20 kg de PV. Las borregas estuvieron alojadas en un corral con agua y alimento a libre acceso y fueron sujetos a sincronización de estros a fin de tenerlos en una etapa sexual similar.

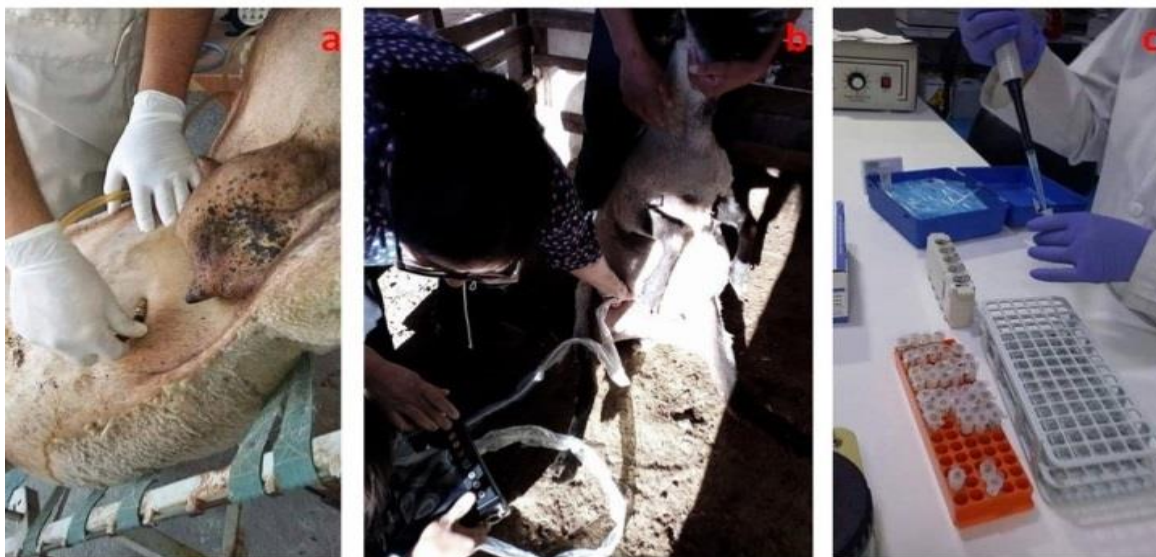


Figura 7. Proceso de la inseminación artificial con endoscopia. a) Inserción del trocar de entrada para el laparoscopio en el momento de la inseminación artificial; b) Ultrasonido 26 días de gestación; c) Separación de suero sanguíneo para analizar concentración de progesterona.

5.3. Tratamientos experimentales

Los animales se distribuyeron al azar en cuatro tratamientos como se muestra en el Cuadro 1. La administración del tratamiento fue vía oral por periodo de cinco días, iniciando siete días antes de la inseminación artificial. El selenio se proporcionó vía oral/animal/día a razón de 0.3 ppm de acuerdo a los requerimientos al del NRC (2007) y se proporcionó en forma de selenito de sodio; en el caso de la levadura enriquecida con selenio antes de realizar la dosificación, se sometió a espectrofotometría de masas (Laboratorio de Hidrociencias, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo) para determinar la concentración de selenio (1363.12 mg selenio/kg) y con base a esta información se procedió a realizar la dosificación. El selenio fue pesado en dosis individuales diarias en balanza analítica marca Bel Engineering modelo HPB-105i con precisión de 0.01 mg.

Cuadro 3. Tratamientos (T) experimentales

Tratamiento	Descripción	Dosis de selenio	Ovejas por tratamiento (n)
T1	Testigo	Sin selenio	5
T2	Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₃)	0.3 ppm	5
T3	Levadura enriquecida con selenio encapsulada	0.3 ppm	5
T4	Levadura enriquecida con selenio	0.3 ppm	5

n= número de animales por tratamiento, ppm= Partes por millón.

5.4. Sincronización de estros

Los animales se sincronizaron utilizando esponjas intravaginales que contenían Cronolone (Chronogest® CR, Laboratorios Intervet), 20 mg de progestágeno sintético por animal que permanecieron colocadas en la vagina por 14 días. El día del retiro de esponjas, se aplicaron 400UI de eCG por hembra (Folligon®, Intervet) para estimular el crecimiento, maduración de folículos, así como la ovulación. La inseminación artificial se realizó 55 horas después del retiro de las esponjas, por el método de endoscopia.

5.5. Obtención de muestras de sangre, suero y frotis sanguíneo

Se inició la toma de muestras sanguíneas dos días antes de la adición con selenio y de forma continua durante 12 días, posteriormente una vez por semana por tres semanas y finalizando los días 60 y 90 post-inseminación.

Muestras de 5 mL de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular de cada oveja, cada muestra se depositó de forma individual en tubos de polipropileno de 15 mL con tapa sin anticoagulante, y se transportaron a 4 °C al laboratorio, donde se mantuvieron en reposo y refrigeración durante 24 horas para la formación de coagulo, transcurrido este tiempo, fueron centrifugadas a 1,000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 5 °C, para separar el suero sanguíneo, el cual se colocó en tubos Eppendorf y se mantuvo congelado a -20 °C hasta posterior determinación de la concentración de progesterona en el laboratorio AIMS A mediante la técnica inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas. El inmunoanálisis para progesterona presenta sensibilidad de 0.02 ng mL⁻¹ y coeficiente de variación intra e interensayo de 4.2 y 6%, respectivamente.

Para realizar los frotis sanguíneos se tomó una gota de sangre de la muestra recolectada por hembra en cada día de muestreo, la cual se colocó en el centro del portaobjetos, en seguida con el empleo de otro portaobjetos colocado a 45° se hizo la extensión de sangre a fin de obtener un barrido uniforme y delgado. Se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente se aplicó alcohol al 96% para fijar la muestra.

Identificadas las muestras se transportaron al módulo de nanotecnología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, donde fueron teñidas con Hematolixina de Gill No.3 (Sigma-Aldrich, Inc.) durante 5 minutos, se realizó un lavado con agua destilada. La observación y conteo diferencial de leucocitos se realizó en cuatro diferentes campos de observación por muestra observados con microscopio óptico normal a resolución 40x.

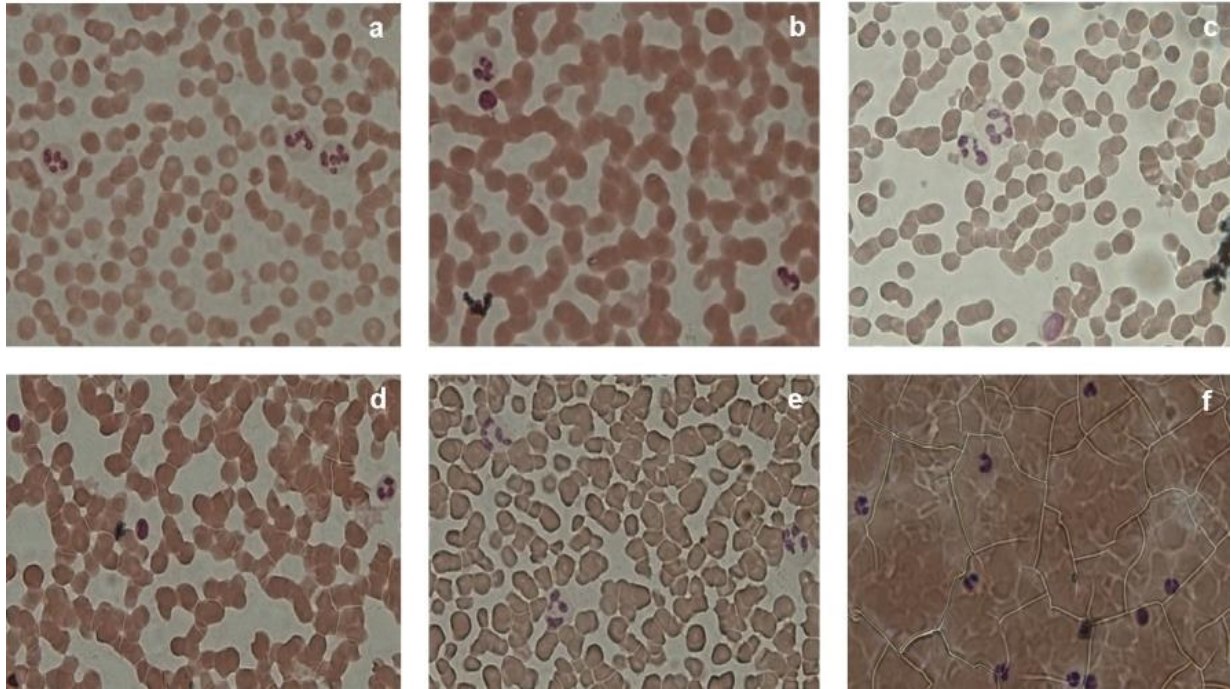


Figura 8. Tinción de frotis sanguíneo realizados con Hematoxilina de Gills, observados en microscopio electrónico Axiocan 503 color Zeizz, con objetivo 40x : a) neutrófilos segmentados, neutrófilo encayado y eritrocitos; b) linfocito, neutrófilos segmentados y eritrocitos; c) neutrófilos segmentados, monocito y eritrocitos; d) linfocitos, eosinófilo y eritrocitos; e) linfocito, neutrófilos segmentados y eritrocitos; f) frotis segmentado por deshidratación, se observan linfocitos y neutrófilos encayados vistos con microscopio óptico normal a 40x.

5.6. Variables evaluadas

5.6.1 Porcentaje de hembras gestantes

Para determinar el porcentaje de hembras gestantes (Tasa de gestación; total de ovejas gestantes en base al total de hembras inseminadas) se realizó diagnóstico de gestación temprano a los veintiséis días posteriores a la inseminación artificial con ecógrafo portátil marca Draminski®, modelo 4Vet mini, con transductor abdominal de 7.5 MHZ; para tal manejo las ovejas fueron dietadas 12 horas antes de realizar la ecografía. La exploración se hizo vía inguinal, el transductor fue colocado buscando detectar inflamación o estructuras embrionarias que indicarán gestación. (Cabe señalar que para este momento de gestación lo comúnmente observado es inflamación y es un tanto difícil observar estructuras embrionarias; para ello se hace requisito realizar un segundo diagnóstico).

5.6.2 Conteo de diferencial de glóbulos blancos en frotis sanguíneo

El conteo diferencial de leucocitos se realizó en frotis sanguíneos teñidos con Hematoxilina de Gill no. 3, el proceso consiste en valorar y reconocer la cantidad y tamaño de los distintos tipos de glóbulos blancos que se observan por placa, el cual permitió conocer el porcentaje de cada clase de célula o glóbulo blanco y así mostrar la predominancia de algún tipo celular, la observación y conteo se realizaron con microscopio electrónico Axiocan 503 color Zeiss, con objetivo 40x.

5.6.3 Determinación de P4

La concentración de P4 se determinó en muestras de suero sanguíneo recolectadas el tercer y quinto día de tratamiento con selenio y los días 1, 4, 13, 20 y 27 pos inseminación (el día 1 en coincidencia con el inicio del desarrollo embrionario, día trece con el momento de implantación, el día 20 con el inicio del funcionamiento cardíaco y el 27 antes de la aparición de placentomas). Las muestras se procesaron en Laboratorio AIMS A ubicado en la Ciudad de México, mediante la técnica de inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas.

5.7. Modelo y análisis estadístico

Se utilizó diseño completamente al azar y la unidad experimental fue cada oveja. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria para cada tratamiento. Para las variables concentración de progesterona y conteo diferencial de globulos blancos en ovejas, se utilizó un modelo mixto lineal con $P \leq 0.05$ (SAS, 2009).

El modelo utilizado fue:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta j_{(i)} + P_K + (\tau P)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

y_{ijk} = variable respuesta (conteo diferencial de glóbulos blancos y concentración de progesterona) en observación k , repetición j , tratamiento i ,

μ = media general

τ_i = efecto del i -ésimo tratamiento

$\delta j_{(i)}$ = error aleatorio asociado con el j -ésimo animal (sujeto) dentro del i -ésimo tratamiento

P_K = efecto del k -ésimo periodo

$(\tau P)_{ik}$ = interacción tratamiento por periodo

ε_{ijk} = error aleatorio asociado con k -ésima medida repetida dentro de j -ésimo animal

Para el caso de porcentajes de hembras gestantes los datos se analizaron mediante estadística multivariada empleando regresión logística con $P \leq 0.05$ usando el paquete estadístico versión 9.4 (SAS, 2004) por ser una variable binaria, es decir se interpreta como gestante o no gestante y no se cumplen las suposiciones de normalidad y homocedasticidad. En este análisis permite pronosticar la probabilidad de ocurrencia de un evento.

$$P(X = \frac{1}{X}) = \frac{e^{(b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p)}}{1 + e^{(b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p)}}$$

Dónde:

P = probabilidad de que la variable Y_i , medida en un animal, tome un valor particular

Y_i = el valor de una variable binaria, de manera que $Y = 1$, si posee la característica de interés o $Y = 0$, de otra manera.

$P(Y = 1/X)$, es decir la probabilidad de que $Y=1$, dado $X = (X_1, X_2, \dots, X_p)$, vector de datos observados o variable explicatoria.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Porcentajes de hembras gestantes

Resultados estadísticos para el promedio de hembras gestantes muestran que no existe diferencia (Figura 9; $P > 0.05$) entre el grupo de hembras testigo en comparación con el grupo que consumió levadura enriquecida con selenio encapsulado, pero si existe diferencia ($P \leq 0.05$) en comparación con aquellas hembras a las que se suministró selenito de sodio. El grupo de hembras tratadas con selenito de sodio presentó la menor ($P \leq 0.05$) cantidad de gestaciones (40%), mientras que las hembras en el grupo testigo y levadura enriquecida con selenio en microcapsulas presentaron 80%, alcanzando el 100% de hembras gestantes que consumieron levadura enriquecida con selenio.

Estos datos son congruentes con lo encontrado en concentración de progesterona, donde las hembras con Selenito de sodio presentaron menor ($P \leq 0.05$) concentración, llegando a valores inferiores a 2 ng ml^{-1} para el día 20 posinseminación artificial. Mientras que, el día 13 pos inseminación, las hembras que consumieron con levadura enriquecida con selenio presentaron mayor concentración y esto coincide con el 100% de gestaciones presentes en este grupo (Figuras 9 y 13; $P \leq 0.05$).

El 100% de hembras gestantes del grupo con que recibió levadura enriquecida con selenio coincide con lo reportado por Pappas *et al.* (2008), quienes mencionan que los efectos del suministro de selenio en dieta de hembras gestantes ayudan al desarrollo adecuado del embrión y asegura la correcta implantación de este; efecto que atribuyen a la biodisponibilidad y a la menor toxicidad que presenta esta fuente de selenio. Además, Yue *et al.* (2009), mencionan que el selenio orgánico se absorbe con facilidad y es inmediatamente metabolizado; en contraste con formas inorgánicas como selenito y selenato de sodio; asimismo, favorece la angiogénesis que estimula el aporte de nutrientes tanto al folículo como al ovocito favoreciendo la reproducción (Delves y Roitt, 2013). Igualmente, Mouatassim *et al.* (1999) y Dennery (2004) reportan que se mejora la calidad del folículo, ovocito y oviducto por acción de la glutatión peroxidasa dependiente de selenio que atrapan formas reactivas de oxígeno, de otra manera el estrés oxidativo influye en el desarrollo embrionario temprano al modificar factores de transcripción y por tanto la expresión génica, todo ello reflejado en el número de hembras gestantes aquí reportado.

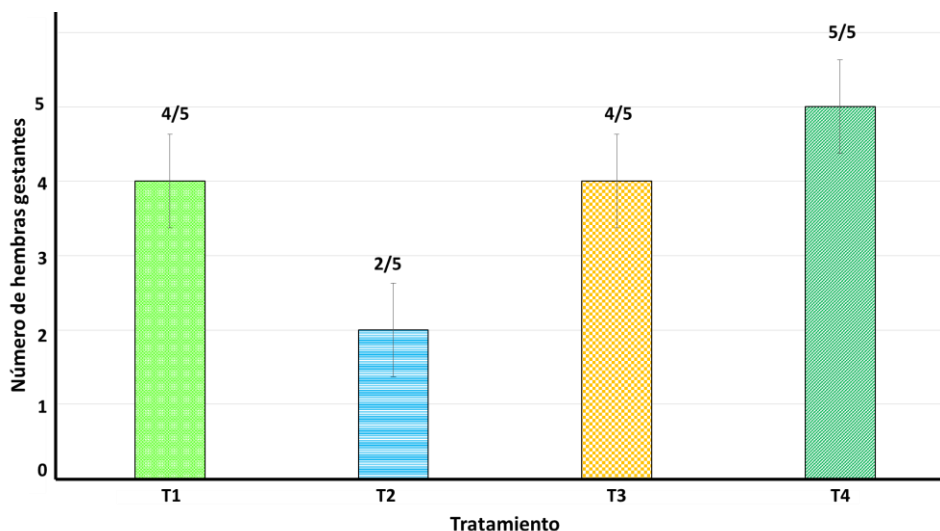


Figura 9. Número de ovejas gestantes por tratamiento. T1: testigo, T2: selenito de sodio (Na_2SeO_3), T3: levadura enriquecida con selenio en polvo encapsulada, T4: levadura enriquecida con selenio.

En la Figura 10 se presentan ecografías de hembras ovinas con diagnóstico de gestación positivo en las cuales se ubicó el saco o vesícula gestacional, observando en color negro presencia de amnios y líquido amniótico, en color gris el tejido muscular, y en gris brillante el útero inflamado, en algunas hembras se ubicó el embrión de aproximadamente 1.5 cm de largo cráneo-caudal (a 26 días de gestación), en algunas hembras también fue posible visualizar el corazón latiendo tal como lo señala González *et al.* (1996). En la ecografía b se observa útero aparentemente vacío, sin claridad de las estructuras antes mencionadas y con presencia de aire (color blanco) lo que dificultó la certeza en el diagnóstico de gestación; sin embargo, se consideraron como negativas basados en lo mencionado por Kahn (1992) y Sales (2005).

La inflamación observada durante los primeros días de gestación se atribuye a células liberadoras de mediadores inflamatorios como son basófilos, mastocitos y eosinófilos, esto es según lo reportado por Delves y Roitt (2013), y que se constata por elevación de basófilos y eosinófilos que se encontró en esta investigación (Figura 12).

Al respecto Abrahams *et al.* (2005), menciona que estas células son de importancia en la gestación en la interfase materno-fetal para que haya implantación exitosa. Por otro lado, la infiltración elevada de leucocitos a este nivel se relaciona con complicaciones en la gestación; esto puede explicar el porque las hembras tratadas con selenito de sodio fueron las que presentaron menor porcentaje de gestación, dado que, en ellas se observó mayor número de

leucocitos en el día 13 posterior a la inseminación artificial; momento en que se registra la implantación.

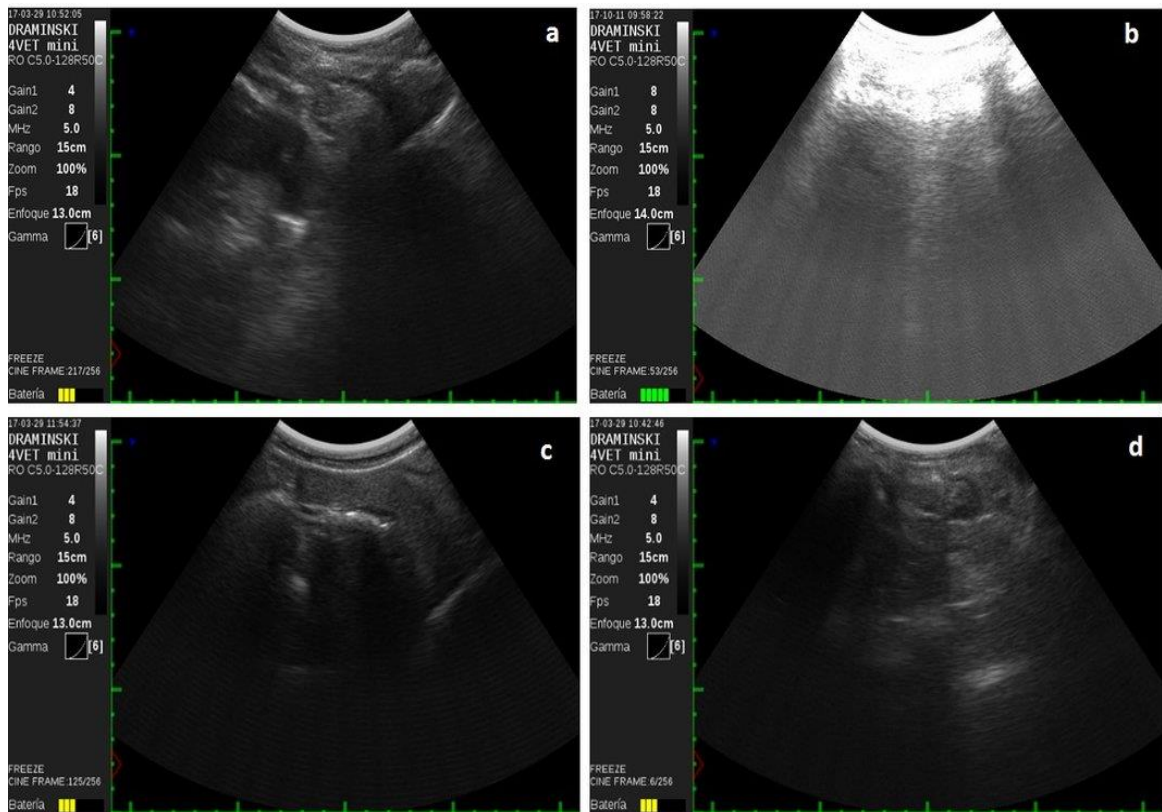


Figura 10. Ecografía del útero de ovejas tratadas con diferentes fuentes de selenio a los 26 días de pos-inseminación artificial. a) Testigo, b) selenito de sodio, c) Levadura enriquecida con selenio encapsulada, d) Levadura enriquecida con selenio en polvo.

El diagnóstico de gestación realizado en esta investigación fue a los 26 días, este periodo se considera como diagnóstico temprano en la especie ovina; no obstante, se obtuvo certeza mayor a 90%; es importante mencionar que la vía utilizada fue la inguinal; sin embargo, fue tan certera como similar a la reportada por Manazza (2007), aunque en el estudio desarrollado por el autor se utilizó la vía transabdominal; sin embargo, difiere con lo reportado por González (1986), quien recomienda la utilización de la vía transabdominal a partir del día 30 de gestación o posterior a estos días garantizando mayor certeza después de los 40 días, momento en que se observa la presencia de cotilidones.

Otro factor positivo para el aumento en precisión del diagnóstico aquí reportado pudo ser la utilización de aceite vegetal en sustitución al gel, como elemento para propiciar adhesión

adecuada entre la piel y el transductor (medio de emisión-traducción). Para el caso de otros medios diferentes al gel utilizado de forma generalizada en ultrasonografía se ha utilizado agua tibia (Sales, 2005; Manazza 2007); sin embargo, esta técnica no ha sido satisfactoria y sólo se reporta del 60 al 70% de exactitud, contrario a lo que se encontró en esta investigación con la utilización de aceite vegetal.

6.2 Conteo diferencial de glóbulos blancos en frotis sanguíneo

En los datos obtenidos en el conteo diferencial de glóbulos blancos (linfocitos, neutrófilos, monocitos, basófilos y eosinófilos) se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas y normalidad; los datos no presentaron comportamiento normal razón por la cual se realizó transformación de datos mediante raíz cuadrada para ser analizados mediante modelo lineal mixto.

Los promedios de conteo diferencial de glóbulos blancos para cada día de muestreo presentaron diferencia ($P \leq 0.05$; Figura 11, 12). Las células que presentaron mayor número fueron linfocitos y neutrófilos.

El resto de células blancas no presentó diferencia entre tratamiento (Figura 11; $P > 0.05$). En la Figura 11a se muestran los resultados para neutrófilos y la disminución en número que se presenta un día antes de la inseminación artificial y que fue similar a la presentada en monocitos (Figura 11b), mientras que las células relacionadas con liberación de mediadores de inflamación aumentaron (eosinófilos y basófilos; Figuras 11c y 11d, respectivamente). Aunque se registra variación en el número de glóbulos blancos inmediatamente después de la inseminación artificial; otro momento puntual es el día 13 posterior a la inseminación artificial y que es coincidente con la implantación embrionaria y reconocimiento materno; en este momento todas las células inmunes presentaron niveles bajos (cero para eosinófilos y basófilos, menos de 0.2 para monocitos y menos de uno para neutrófilos 11; a, b, c y d; $P \leq 0.05$).

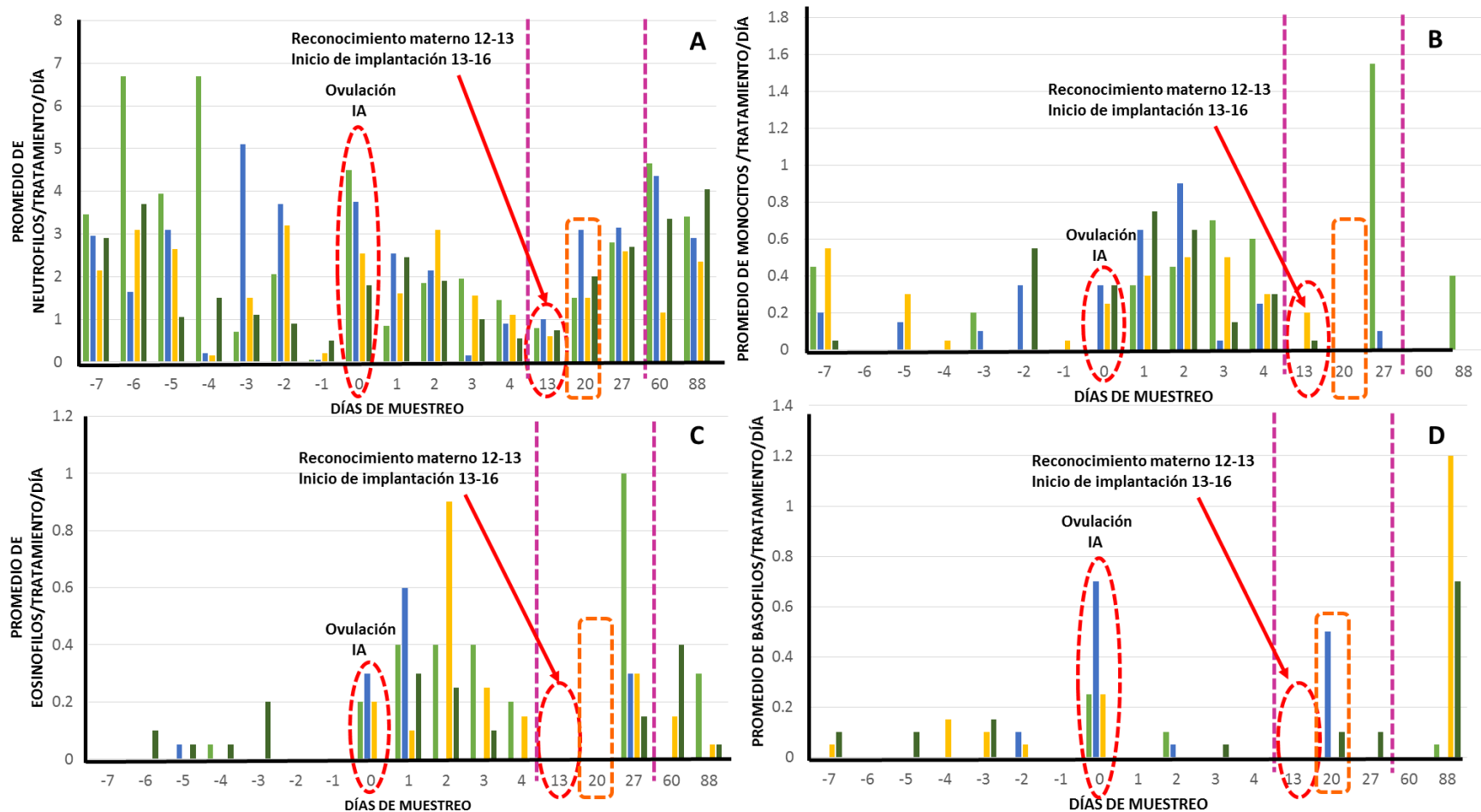


Figura 11. Conteo diferencial de glóbulos blancos: (A) neutrófilos; (B) monocitos; (C) eosinófilos; (D) basófilos en conteo diferencial de glóbulos blancos (WBC) en frotis sanguíneo realizado por 12 días consecutivos, iniciando siete días antes de la inseminación artificial (IA) y cuatro días después de IA. Posteriormente el sangrado fue una vez por semana durante tres semanas consecutivas (perido marcado el líneas punteadas de color rosa), para finalizar con los sangrados los días 60 y 88 post IA en ovejas tratadas con distintas fuentes de Selenio en época de anestro estacional. Las barras en color verde representan al T1: testigo, barras en color azul T2: selenito de sodio (Na_2SeO_3), barras en color amarillo T3: levadura enriquecida con Selenio en polvo encapsulada y barras en color verde bandera T4: levadura enriquecida con Selenio. El día 13 post IA; marcado con un ovalo color rojo, coincide con el reconocimiento materno e implantación embrionaria, día 20 post IA, marcado con rectángulo color naranja, se perciben los latidos cardiacos del embrión. El tratamiento se suministro por cinco días consecutivos, finalizando un día antes a la inseminación artificial.

Respecto al número de linfocitos (Figura 12) presentes durante el periodo de adición del selenio, se presentó variación en el número, sin importar el tratamiento ($P \geq 0.05$); sin embargo, el día que se inseminó a las hembras se registró disminución para todos los tratamientos; la reducción de este tipo de células puede ser elemento importante para evitar el rechazo de los espermatozoides, además el número bajo una vez más para los días 3 y 4; momento en que se registra la fecundación y entrada del embrión al útero. Otro momento importante en que disminuyeron estas células fue durante la implantación (día 13). Para mantenerse elevado después de este momento que además coincide con el desarrollo de placentomas (Byers y Kramer, 2010). Este aumento puede no dañar al embrión dado que la barrera placentaria se encuentra protegiéndolo; no obstante, Draca (2002) describe que durante la gestación, el sistema inmunológico de la madre disminuye hasta el tercer trimestre de gestación esto es contrario a lo reportado en este estudio dado que se refiere a los primeros días de gestación y no al último tercio, si bien en este trimestre la presencia de macrófagos y neutrófilos circulantes en sangre aumentan para realizar fagocitosis proceso de liberación de ROS y tiempo en que la presencia de selenio puede ser de importancia. Además de acuerdo a Barrera *et al.* (2007) durante la gestación el feto esta protegido por moléculas inmunomoduladoras; progesterona, enzima 2-3-dioxigenasa, radicales libres y glicodelina, donde la progesterona participa en el mantenimiento de la gestación en humanos y animales y aumenta considerablemente durante la gestación para alcanza concentraciones capaces de disminuir la actividad linfocitaria, también funciona a través de receptor intracelular y regula, aspectos celulares y moleculares implicados en el proceso de implantación, siendo importante para reducir la capacidad reactiva de la madre contra los antígenos fetales.

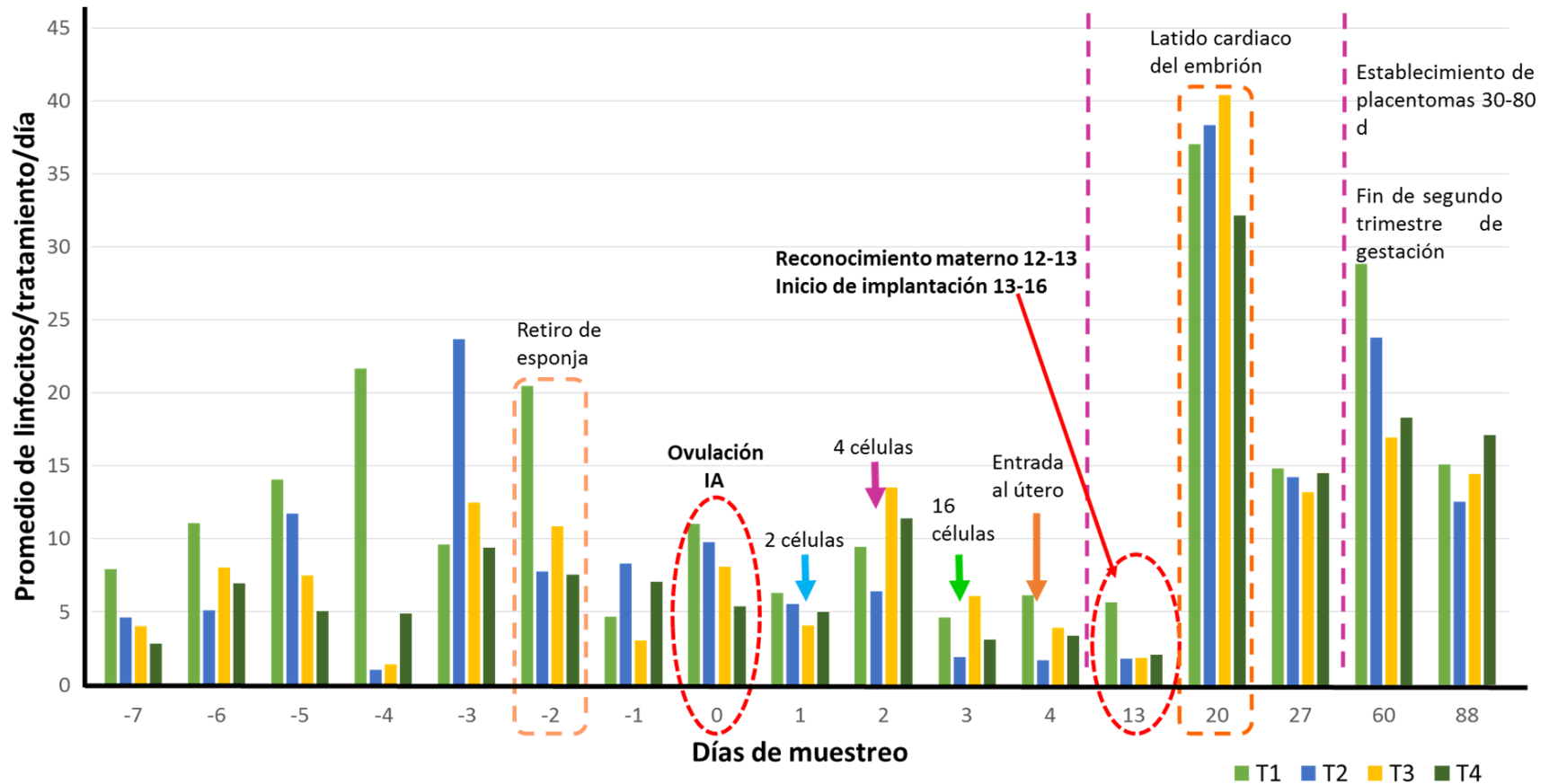


Figura 12. Promedio de linfocitos por tratamiento en conteo diferencial de glóbulos blancos (WBC) en frotis sanguíneo realizado por 12 días consecutivos, iniciando siete días antes de la inseminación artificial (IA) y cuatro días después de IA, posteriormente el sangrado fue una vez por semana durante tres semanas consecutivas (perido marcado el líneas punteadas), para finalizar con los sangrados los días 60 y 88 post IA en ovejas tratadas con distintas fuentes de Selenio en época de anestro estacional, las barras en color verde representa al T1: testigo, barras en color azul T2: selenito de sodio (Na_2SeO_3), barras en color amarillo T3: levadura enriquecida con Selenio en polvo encapsulada y barras en color verde bandera T4: levadura enriquecida con Selenio. El día 13 pos IA coincide con el reconocimiento materno e implantación embrionaria; día 20 post IA se perciben los latidos cardiacos del embrión. El tratamiento se dio cinco días consecutivos finalizando un día antes de la IA.

6.3 Concentración de progesterona en plasma sanguíneo de ovejas gestantes

La concentración de progesterona por tratamiento no presentó diferencia significativa ($P \geq 0.05$); sin embargo, la concentración por tratamiento y día de muestreo fue diferente ($P \leq 0.05$), observándose valores bajos en todos los tratamientos antes de la inseminación artificial y valores altos se observaron cuatro días después de la inseminación artificial; específicamente el grupo de hembras que recibió Selenito de sodio presentó menor concentración para estos días (Cuadro 4).

Los resultados en concentración de progesterona antes de inseminar a las hembras no son diferentes a lo esperado dado que este momento está marcado por el desarrollo folicular y concentraciones altas de estradiol y no de esta hormona.

Por otro lado, elevación de progesterona es requisito después de la inseminación y sobre todo en el momento de entrada del óvulo fecundado al útero; momento que coincide con el día cuatro del muestreo en esta investigación y es congruente con lo reportado por Wheeler *et al.* (1977).

Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados en interacción efecto tratamiento por día para concentración de progesterona (P_4) en hembras tratadas con diferentes fuentes de selenio

Tratamiento	n	Antes de Inseminación artificial		Después de inseminación artificial				
		D3	D5	D1	D4	D13	D20	D27
T1	5	0.28	0.25	0.25	3.17	5.56 ^{ab}	4.51 ^a	5.06 ^a
T2	5	0.25	0.20	0.30	1.99	4.48 ^b	1.32 ^b	1.72 ^b
T3	5	0.22	0.19	0.25	2.51	9.73 ^a	5.38 ^a	6.62 ^a
T4	5	0.28	0.25	0.30	1.67	4.84 ^b	5.18 ^a	5.43 ^a

a, b: Literales en la misma columna indican diferencias ($P \leq 0.05$).

Las hembras que recibieron Selenito de sodio presentaron baja concentración de progesterona y se relacionó con menor número de hembras gestantes, lo que indica que en ausencia de implantación del blastocito el CL sufre regresión luteal, permitiendo el inicio de un nuevo ciclo folicular (Tomac, 2011), o también puede atribuirse a toxicidad en cuerpo luteo, pero también en el embrión provocando interrupción de la gestación o falla de la misma. Otra explicación de la disminución de progesterona en este grupo de hembras puede estar asociada a regresión luteal temprana que para el caso de ovejas y de acuerdo a Herrera *et al.* (1990) ocurre con relativa frecuencia. En contraste, las hembras a las que se aplicó levadura enriquecida con selenio presentaron mayor concentración de progesterona que puede asociarse a mayor biodisponibilidad en el organismo de este mineral, además de ser fácilmente absorbida (Karsch

et al., 1979), lo que favorece o estimula la angiogénesis en el ovario, originando folículos de mejor calidad (Vázquez *et al.*, 2017), con fecundación e implantación exitosa.

En general el selenio orgánico (levadura enriquecida con selenio microencapsulado o no) no provocó mejora en la respuesta (estadística) en comparación a las hembras testigo; no obstante, se apreciaban diferencias numéricas. Yue *et al.* (2009) mencionan que la adición de selenio orgánico a hembras ayuda en la formación de selenoproteínas importantes en la homeostasis redox, además mejora la viabilidad del oocito y células de la granulosa, efecto que se expresa en la sanidad del folículo y producción de progesterona alargando el tiempo de vida del cuerpo luteo; eventos indispensables para que se lleven a cabo implantación del blastocito y mantenimiento de la gestación.

Surai *et al.* (1998) mencionan que el selenio participa en la protección de membranas celulares ante la degeneración oxidativa a causa de radicales libres productos del metabolismo; por lo que, la falta de este micronutriente ocasiona la degradación de tejidos, por tal razón se puede pensar que el selenio inorgánico ocasiona problemas de toxicidad a nivel tisular, específicamente ovario, teniendo poca angiogénesis y produciendo poca concentración de progesterona; dicho supuesto se basa en lo reportado en diversos estudios realizados en tracto reproductivo femenino y sobre las funciones que desempeñan las especies reactivas de oxígeno en ovarios, trompas de Falopio y embriones (Jozwik *et al.*, 1999; Mouatassim *et al.*, 1999; Behrman *et al.*, 2001 y Guerin *et al.*, 2001), tanto en animales como en humanos; permitiendo afirmar que las formas reactivas de oxígeno están involucradas en numerosas funciones fisiológicas reproductivas como son maduración de los ovocitos, esteroidogénesis en ovario, función de CL y luteolisis, así como en el metabolismo del embrión y de su entorno (Ishikawa *et al.*, 1993; Sabatini *et al.*, 1999; Behrman *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 2017).

La progesterona es importante para mantener la gestación ya que controla la receptividad del endometrio, la implantación del blastocito, el desarrollo de la placenta, el reclutamiento de células NK de la decidua, regula el reconocimiento de antígenos del CMH paterno, la polaridad de células T efectoras, la sensibilidad de células presentadoras de antígeno y suprime la actividad de los macrófagos; de lo anterior se induce la inmunosupresión a través de la producción de citoquinas tipo Th2 (Barrera *et al.*, 2007), estos pudieron ser elemento faltantes de las hembras con Selenito de sodio lo que ocasionó la disminución en el número de gestaciones.

7. CONCLUSIONES

Selenio orgánico proporcionado a ovejas de forma oral al inicio de época de anestro estacional propicia concentraciones similares de progesterona e índices de fertilidad a las observadas en el grupo testigo, pero superior a las registradas en ovejas que recibieron selenito de sodio.

El selenio inorgánico (selenito de sodio) disminuyó la concentración de progesterona, que se reflejó en baja fertilidad (evaluada con el diagnóstico de gestación a 26 días posteriores a la inseminación artificial) e implantación embrionaria.

La fuente de selenio no fue diferente en la respuesta de inmunidad celular. La falta de respuesta en fertilidad de hembras con selenito de sodio pudo ser a causa de toxicidad.

8. RECOMENDACIONES

Una de las limitantes del trabajo fue el número de observaciones experimentales (ovejas) por lo que es conveniente aumentar el tamaño de muestra para aumentar confiabilidad en los resultados. También se sugiere realizar análisis de selenio contenido en la dieta proporcionada a los animales, para recalcular la dosis de selenio otorgada en los tratamientos.

9. LITERATURA CITADA

- Abrahams V.M., Kim Y.M., Straszewski S.L., Romero R., Mor G. 2004. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 51(4):275-282.
- Abrahams V.M., Visintin I., Aldo P.B., Guller S., Romero R. 2005. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J Immunol*. 175(12): 8096-8104.
- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 79: 829-843.
- Agarwal A., Allamaneni S.S., 2004. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, 9: 338-347.
- Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol*, 3(2)8: 1477-7827
- Agarwal A., Gupta S., Sekhon L., Shah R. 2008. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antiox. Redox Signal*, 10: 1375-1403.
- Al-Gubory K.H., Huet J.C., Pernollet J.C., Martal J., Locatelli A. 2003. Corpus luteum derived copper, zinc dismutase serves as a luteinizing hormone-release inhibiting factor in sheep. *Mol. Cell. Endocrinol*, 199: 1-9.
- Al-Gubory K.H., Bolifraud P., Germain G., Nicole A., Ceballos-Picot I. 2004. Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Reprod*, 128: 767-774.
- Al-Gubory K.H., Ceballos-Picot I., Nicole A., Bolifraud P., Germain G., Michaud M., Mayeur C., Blachier F. 2005. Changes in activities of superoxide dismutase, nitric oxide synthase, glutathione-dependent enzymes and the incidence of apoptosis in sheep corpus luteum during the estrous cycle. *Biochem. Biophys. Acta*, 1725: 348-357.
- Al-Gubory K.H., Fowler P.A., Garrel C. 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 42: 1634-1650.
- Álvarez F.G., Bustos J.I., Castañeda P.C., Guevara F.J., Romero A.I., Vázquez M.H. 2010. *Mensaje Bioquímico*, 34: 121- 133.
- Anosa V.O. 1993. Ultrastructure of developing and mature caprine leukocytes. *Anat Histol Embryol*, 22: 328-341.
- Archer R.K. y Jeffcott L.B. 1977. *Comparative Clinical Hematology*. Oxford: Blackwell Scient, 305-344.
- Arianmanesh M., McIntosh R., Lea R.G., Fowler P.A., Al- Gubory K.H. 2011. Ovine corpus luteum proteins, with functions including oxidative stress and lipid metabolism, show complex alterations during implantation. *J. Endocrinol*, 210: 47-58.
- Arnaut M.A. y Michishita M. 1993. Genetic abnormalities in leukocyte adhesion molecule deficiency. In: Gupta S, Griscelli C, eds. *New concepts in immunodeficiency diseases*. Chichester, England. John Wiley, 191-202.
- Arosh J.A., Banu S.K., Chapdelaine P., Madore E., Sirois J., Fortier M.A. 2004. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinol*, 145: 2551-2560.
- Arredondo F., Noble L.S. 2006. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin. Reprod. Med*, 24: 33-39.

- Aten R.F., Kolodecik T.R., Rossi M.J., Debusscher C., Behrman H.R. 1998. Prostaglandin f2alpha treatment in vivo, but not in vitro, stimulates protein kinase C-activated superoxide production by nonsteroidogenic cells of the rat corpus luteum. *Biol. Reprod*, 59: 1069-1076.
- Attaran M., Pasqualotto E., Falcone T., Goldberg J.M., Miller K.F., Agarwal A., Sharma R.K. 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 45:314-320.
- Auletta F.J. and Flint, A.P. 1988. Mecanismos controlling corpus luteum function in sheep, cows, nonhumanprimates, and women specially in relation to the time of luteolysis. *Endocr. Rev*, 9: 88-105.
- Banyer J.L., Hamilton N.H., Ramshaw I.A., Ramsay A.J. 2000. Cytokines in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogene*, 2: 359-73.
- Barker J.E., Pierce J.E. y Nienhuis A.W. 1980. Hemoglobin switching in sheep: a comparison of the erythropoietin - induced switch to HbC and the fetal to adult hemoglobin switch. *Blood*, 56: 488-494.
- Barrera D., Avila E., Díaz L. 2007. Immunological role of progesterone in the maintenance of pregnancy. *Rev Invest Clin*, 59(2): 139-145.
- Bedaiwy M.A., Falcone T., Sharma R.K., Goldberg J.M., Attaran M., Nelson D.R., Agarwal A. 2002. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod*, 17: 426-431.
- Behrman H.R. y Aten R.F. 1991. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. *Endocrinology* 128: 2958–2966.
- Behrman H.R., Kodaman P.H., Preston S.L., Gao S. 2001. Oxidative stress and the ovary. *J. Soc. Gynecol. Investig*, 8: S40-S42.
- Byers SR., Kramer JW. 2010. Normal hematology of sheep and goats. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Ames, IA: Blackwell Publishing, 836-842
- Brito G.F., Yamazaki M.A., Espinosa P.S., Vázquez T.O., Huerta L.J y Berrón P.R. 2003. Eosinofilos: revisión de literatura. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*, 12(2): 56-62.
- Bruce N.W., Hisheh S., Dharmarajan A.M. 2001. Patterns of apoptosis in the corpora lutea of the rat during the oestrous cycle, pregnancy and in vitro culture. *Reprod. Fert. Dev*, 13: 105-109.
- Burton G.J., Hempstock J., Jauniaux E. 2003. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed*, 6:84-96.
- Carlson J.C., Wu X.M., Sawada M. 1993. Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum function. *Free Radic. Biol. Med*, 14: 79-84.
- Catt J.W., Henman M. 2000. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod*, 15(Suppl 2): 199-206.
- Chan A.C. 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol*, 71: 725-731.
- Christenson L.K. y Devoto L. 2003. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. *Reprod. Biol. Endocrinol*, 1: 1-9.
- Chung H.T., Pae H.O., Choi B.M., Billiar T.R., Kim Y.M. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 282:1075-1079.

- Chui D.K., Pugh N.D., Walker S.M., Gregory L., Shaw R.W. 1997. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod*, 12:191-196.
- Crempien C.L. 1988. Deficiencia del selenio en ovejas. *IPA La Platina* 47: 33-34.
- De Bruin J.P., Dorland M., Spek E.R., Posthuma G., van Haften M., Looman C.W., te Velde E.R. 2002. Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biol Reprod*, 66: 1151-1160.
- Delves P.J. y Roitt I.M. 2013. The Immune System. *The New England J. Med.* 343 (1): 37-49.
- Dennery P.A. 2004. Role of redox in fetal development and neonatal diseases. *Antioxid Redox Signal*, 6: 147-53.
- De Matos D.G., Furnus C.C. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenol*, 53: 761-771.
- Diskin M.G. y Morris D.G. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim*, 43: 260-267.
- Dong M., Shi Y., Cheng Q., Hao M. 2001. Increased nitric oxide in peritoneal fluid from women with idiopathic infertility and endometriosis. *J Reprod Med*, 46: 887-891.
- Draca S. 2002. Is pregnancy a model how we should control some autoimmune diseases? *Autoimmun*, 35(5): 307-312.
- Elbaum D.J. y Keyes P.L. 1976. Synthesis of 17 β -estradiol by isolated ovarian tissues of the pregnant rat: aromatization in the corpus luteum. *Endocrinol*, 99: 573-579.
- Ekerhovd E., Brannstrom M., Alexandersson M., Norstrom A. 1997. Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Hum Reprod*, 12: 301-305.
- Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México, consultado en internet en octubre de 2017.
<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15028a.html>
- Fainaru O., Almog B., Pinchuk I., Kupfermanc M.J., Lichtenberg D., Many A. 2002. Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo. *BJOG*, 109: 938-941.
- Foyouzi N., Cai Z., Sugimoto Y., Stocco C. 2005. Changes in the expression of steroidogenic and antioxidant genes in the mouse corpus luteum during luteolysis. *Biol. Repro*, 72: 1134-1141.
- Garrel C., Ceballos-Picot I., Germain G., Al-Gubory K.H. 2007. Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F $_{2\alpha}$ -induced luteal cell death in vivo. *Free Radic. Res*, 41: 251-259.
- Gobbetti A., Boiti C., Canali C., Zerani M. 1999. Nitric oxide synthase actually regulates progesterone production by in vitro cultured rabbit corpora lutea. *J. Endocrinol*, 160: 275-283.
- González R. 1986. Diagnostico de preñez en ovejas. Revisión bibliográfica. *Comunicación Técnica Prod. Animal* No. 11, INTA Bariloche, 6: 329-337.
- González B., Santiago M.J., García L.M. y López S.A. 1996. Imagen ecográfica de las estructuras y órganos fetales en la oveja. *Med. Vet*, 13 (5): 319-329.
- Graham J.D. y Clarke C.L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev*, 18: 502-519.

- Gregoraszczuk E.L. y Oblonczyk K. 1996. Effect of aspecific aromatase inhibitor on oestradiol secretion by porcine corpora lutea at various stages of the luteal phase. *Reprod. Nutr. Dev*, 36: 65-72.
- Guerin P., Mouatassim S., Menezo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7: 175-189.
- Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C.E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*, 119: 598-620.
- Hanafy K.A., Krumenacker J.S., Murad F. 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, 7: 801-819.
- Herrera H.L., Feldman S.D., Zarco L., Valencia M.J., Ortiz H.A., Ángeles C.S. 1990. Evaluación del efecto luteolítico de la prostaglandina PGF₂ alfa en diferentes días del ciclo estral de la borrega. *Vet Méx*, 21(2): 143-147.
- Harvey J.W. 1998. The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. San Diego: Academic Press 157-203.
- Harvey J.W. 2002. *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals*. Philadelphia: Saunders, 39(1):2335-2376.
- Harvey A.J., Kind K.L., Thompson J.G. 2002. REDOX regulation of early embryo development. *Reprod*, 123: 479-486.
- Heikkinen J., Möttönen M., Komi J., Alanen A., Lassila O. 2003. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol*, 131(3): 498-505.
- Huppertz B. 2007. The fetomaternal interface: setting the stage for potential immune interactions. *Semin Immunopathol*, 29(2): 83-94.
- Houser B., Tilburg T., Hill J., Nicotra M., Strominger J. 2011. Two unique human decidual macrophage populations. *J Immunol*, 186(4): 2633-2642.
- Ho Y.S., Gargano M., Cao J., Bronson R.T., Heimler I., Hutz R.J. 1998. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem*, 273: 7765-7769.
- Iglesias M., Guzmán R., Martínez O., Restrepo J.F., Iglesias A. 2002. Inmunología de la reproducción. *Acta Med Colomb*, 27(3): 170-180.
- Ishikawa M. 1993. Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 45: 842-848.
- Juengel J.L., Garverick H.A., Johnson A.L., Youngquist R.S., Smith M.F. 1993. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinol*, 132: 249-254.
- Jozwik M., Wolczynski S., Szamatowicz M. 1999. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*, 5: 409-413.
- Kato H., Sugino N., Takiguchi S., Kashida S., Nakamura Y. 1997. Roles of reactive oxygen species in the regulation of luteal function. *Rev. Reprod*, 2: 81-83.
- Karsch F.J., Foster D.L., Legan S.J., Ryan K.D., Peter G.K. 1979. Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: interrelationship of estradiol, progesterone, and luteinizing hormone. *Endocrinol*, 105(2): 421-426.
- Kitagawa Y., Suzuki K., Yoneda A., Watanabe T. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenol*, 62: 1186-1197.
- Laloraya M., Pradeep K.G., Laloraya M.M. 1988. Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of *Rattus norvegicus* and

- induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 157: 146-153.
- Laloraya M., Kumar G.P., Laloraya M.M. 1989. A possible role of superoxide anion radical in the process of blastocyst implantation in *Mus musculus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 161: 762-770.
- Lane M., Maybach J.M., Gardner D.K. 2002. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Hum Reprod*, 17: 2686-2693
- LaPolt P.S., Leung K., Ishimaru R., Tafoya M.A., You-hsin Chen J. 2003. Roles of cyclic GMP in modulating ovarian functions. *Reprod Biomed Online*, 6: 15-23.
- Lasky L.A. 1995. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of then inflammatory response. *Annu Rev Biochem*, 64: 113-39.
- Lee K.S., Joo B.S., Na Y.J., Yoon M.S., Choi O.H., Kim W.W. 2000. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet*, 17: 222-228.
- Lee T.H., Wu M.Y., Chen M.J., Chao K.H., Ho H.N., Yang Y.S. 2004. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*, 82: 126-131.
- Leyendecker G., Kunz G., Wildt L., Beil D., Deininger H. 1996. Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Hum Reprod*, 11: 1542-1551.
- Masuda M., Kubota T., Karnada S., Aso T. 1997. Nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod*, 3: 285-292.
- Manazza J. 2007. Diagnostico de preñez en Ovinos. Disponible en www.produccion-animal.com.ar, 134-139. Consultado en enero de 2018.
- McCormack J.T., Friederichs M.G., Limback S.D., Greenwald G.S. 1998. Apoptosis during spontaneous luteolysis in the cyclic golden hamster: biochemical and morphological evidence. *Biol. Reprod*, 58: 255-260.
- McDowell L.R. 2003. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. 2nd ed. Elsevier Science, Amsterdam. 4(11): 703-708.
- Mello Filho A.C., Hoffmann M.E., Meneghini R. 1984. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J*, 218: 273-275.
- Minegishi K., Tanaka M., Nishimura O., Tanigaki S., Miyakoshi K., Ishimoto H., Yoshimura Y. 2002. Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, 283: E1308-E1315.
- Mock D.M., Mock N.I. y Lankford G.L. 2008. Red cell volume can be accurately determined in sheep using a non - radioactive biotin label. *Pediatr Res*, 64(5):528-532.
- Moncada S. and Erusalimsky J.D. 2002. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, 3: 214-220.
- Mocatta T.J., Winterbourn C.C., Inder T.E., Darlow B.A. 2004. The effect of gestational age and labour on markers of lipid and protein oxidation in cord plasma. *Free Radic Res*, 38: 185-191.
- Moffett A., Loke Y.W. 2004. The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal. *Placenta*, 25(1): 1-8.

- Motta A.B., Estevez A., Franchi A., Perez-Martinez S., Farina M., Ribeiro M.L., Lasserre A., Gimeno M.F. 2001. Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF₂a during luteal regression in rats. *Reprodu*, 121: 631-637.
- Mouatassim S., Guerin P., Menezo Y. 1999. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod*, 5: 720-725.
- Myatt L., Cui X. 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell*, 122:369-382.
- Nicol C.J., Zielenski J., Tsui L.C., Wells P.G., 2000. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *Faseb J*, 14: 111-127.
- Nagamatsu T., Schust D.J. 2010. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci*, 17(3): 209-218.
- Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K., McIntush E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev*, 80: 1-29.
- Noda Y., Ota K., Shirasawa T., Shimizu T. 2012. Copper/zinc superoxide dismutase insufficiency impairs progesterone secretion and fertility in female mice. *Biol. Reprod*, 86: 1-8.
- Okuda K., Uenoyama Y., Berisha B., Lange I.G., Taniguchi H., Kobayashi S., Kobayashi S., Miyamoto A., Schams D. 2001. Estradiol-17beta is produced in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod*, 65: 1634-1639.
- Olson L.M., Jones-Burton C.M., Jablonka-Shariff A. 1996. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinol*, 137: 3531-3539.
- Ota H., Igarashi S., Hatazawa J., Tanaka T. 1998. Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*, 69: 303-308.
- Ota H., Igarashi S., Hatazawa J., Tanaka T. 1999. Endometriosis and free radicals. *Gynecol Obstet Invest*, 48(1): 29-35.
- Ohl J., Lefebvre-Maunoury C., Wittemer C., Nisand G., Laurent M.C., Hoffmann P. 2002. Nitric oxide donors for patients undergoing IVF. A prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hum Reprod*, 17: 2615-2620.
- Osborn B.H., Haney A.F., Misukonis M.A., Weinberg J.B. 2002. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*, 77: 46-51.
- Oztezcan S., Turkoglu U.M., Kervancioglu E., Kocak T., Kocak-Toker N., Aykac-Toker G. 1999. In vitro effects of peroxynitrite on human spermatozoa. *Andrologia*, 31:195-198.
- Paszkowski T., Traub A.I., Robinson S.Y., McMaster D. 1995. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta*, 236: 173-180.
- Pate J.L. y Landis Keyes P. 2001. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Reprod*, 122: 665-676.
- Pappas A.C., Zoidis E., Surai P.F., Zervas G. 2008. Selenoproteins and maternal nutrition. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem Mol. Biol*, 151(4): 361-372.
- Pernthaner A., Stankiewicz M., Bisset S.A. 1995. The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: lymphocyte

- blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. *Intl J Parasitol* 25: 523-529.
- Pierce J.D., Cackler A.B., Arnett M.G. 2004. Why should you care about free radicals? *RN*, 67: 38-42.
- Polak G., Koziol-Montewka M., Gogacz M., Blaszkowska I., Kotarski J. 2001. Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 94: 261-263.
- Pressman EK, Cavanaugh JL, Mingione M, Norkus EP, Woods JR. 2003. Effects of maternal antioxidant supplementation on maternal and fetal antioxidant levels: a randomized, double-blind study. *Am J Obstet Gynecol*, 189: 1720-1725.
- Ramírez, L. 2006. Los Leucocitos En Mamíferos Domésticos. *Mundo Pecuario*, 2 (2):37-39.
- Reyna E., Prieto M., Torres M., Reyna N., Mejía J. 2002. Peroxidación lipídica en gestaciones con preeclampsia y diabetes. *Rev Obstet Ginecol Venez*, 62: 93-96.
- Reynaert N.L., Ckless K., Wouters E.F., van der Vliet A., Janssen-Heininger Y.M. 2005. Nitric oxide and redox signaling in allergic airway inflammation. *Antioxid Redox Signal*, 7: 129-143.
- Rico R.M. y Vega R. G. 2012. Mecanismos inmunológicos involucrados en la gestación. *Ginecol Obstet*, 80(5): 332-340
- Rosselli M., Keller P.J., Dubey R.K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update*, 4: 3-24.
- Rueda B.R., Tilly K.I., Hansen T.R., Hoyer P.B., Tilly J.L. 1995. Expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the bovine corpus luteum: evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. *Endo*, 3: 227-232.
- Rusterholz C., Hahn S., Holzgreve W. 2007. Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. *Semin Immunopathol*, 29: 151-162.
- Ryan K.J. 1969. The foeto-placental unit. In: Pe'cicle, A., Finzi, C. (Eds.), *Theoretical Basis for Endocrine Control of Gestation A Comparative Approach*. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 120-131.
- Sabatini L., Wilson C., Lower A., Al-Shawaf T., Grudzinskas J.G. 1999. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 72: 1027-1034.
- Sales F. 2005. Ultrasonografía en Ovinos: Optimizando el uso de las praderas. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Punta Arenas. *Boletín INIA* 132: 15-21.
- SAS, 2004. Versión 9.4 for Windows edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Sawada M. y Carlson J.C. 1991. Rapid plasma membrane changes in superoxide radical formation, fluidity, and phospholipase A2 activity in the corpus luteum of the rat during induction of luteolysis. *Endocrinol*, 128: 2992-2998.
- Sawada M. y Carlson J.C. 1996. Intracellular regulation of progesterone secretion by the superoxide radical in the rat corpus luteum. *Endocrinol*, 137: 1580-1584.
- Schrier R.W. y Wang W. 2004. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*, 351: 159-169.
- Sharma R.K. y Agarwal A., 2004. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reprod Med Bio*, 3: 177-199.
- Shikone T., Yamoto M., Kokawa K., Yamashita K., Nishimori K., Nakano R. 1996. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 2376-2380.

- Shiotani M., Noda Y., Narimoto K., Imai K., Mori T., Fujimoto K. y Ogawa K. 1991. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Hum Reprod*, 6: 1349-1353.
- Shutt D.A., Shearman R.P., Lyneham R.C., Clarke A.H., McMahon G.R., Goh P. 1975. Radioimmunoassay of progesterone, 17-hydroxyprogesterone, estradiol-17 β and prostaglandin F in human corpus luteum. *Steroids*, 26: 299-310.
- Singh U., Nicholson G., Urban B.C., Sargent I.L., Kishore U., López-Bernal A. 2005. Immunological properties of human decidual macrophages- a possible role in intrauterine immun. *Reprod*, 129(5): 631-637.
- Skarzynski D.J. y Okuda K. 2000. Different actions of noradrenaline and nitric oxide on the output of prostaglandins and progesterone in cultured bovine luteal cells. *Prostaglandin Other Lipid Mediat*, 60: 35-47.
- Stadler J., Trockfeld J., Schmalix W.A., Brill T., Siewert J.R., Greim H., Doehmer J. 1994. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3559-3563.
- Stocco C., Telleria C., Gibori G. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 28: 117-149.
- Sugino N., 2006. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Anim. Sci. J*, 77: 556-565.
- Sugino N. y Okuda K. 2007. Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *J. Reprod. Dev*, 53: 977-986.
- Sugino N., Nakamura Y., Takeda O., Ishimatsu M., Kato H. 1993a. Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J. Reprod. Fert*, 97: 347-351.
- Sugino N., Nakamura Y., Okuno N., Ishimatsu M., Teyama T., Kato H. 1993b. Effects of ovarian ischemia-reperfusion on luteal function in pregnant rats. *Biol. Reprod.* 49, 354-358.
- Sugino N., Shimamura K., Tamura H., Ono M., Nakamura Y., Ogino K., Kato H. 1996. Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinol*, 137: 749-754.
- Sugino N., Takiguchi S., Kashida S., Takayama H., Yamagata Y., Nakamura Y., Kato H. 1999. Suppression of intracellular superoxide dismutase activity by antisense oligonucleotides causes inhibition of progesterone production by rat luteal cells. *Biol. Reprod.* 61: 1133-1138.
- Sugino N., Takiguchi S., Kashida S., Karube A., Nakamura Y., Kato H. 2000a. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol. Hum. Reprod*, 6: 19-25.
- Sugino N., Suzuki T., Kashida S., Karube A., Takiguchi S., Kato H. 2000b. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 85: 4379-4386.
- Surai P., Kostjuk I., Wishart G., MacPherson A., Speake B., Noble R., Ionov I., Kutz E. 1998. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biol Trace Elem Res*, 64: 119-132.
- Suzuki T., Sugino N., Fukaya T., Sugiyama S., Uda T., Takaya R., Yajima A., Sasano H. 1999. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril*, 72: 720-726.

- Szczepanska M., Kozlik J., Skrzypczak J., Mikolajczyk M. 2003. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril*, 79: 1288-1293.
- Szekeres-Bartho J., Polgar B., Kozma N., Miko E., Par G., Szereday L. 2005. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy*, 89: 118-125.
- Szekeres-Bartho J. 2009. Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy*, 1(5): 873-882.
- Szekeres-Bartho J., Halasz M., Palkovics T. 2009. Progesterone in pregnancy; receptor ligand interaction and signaling pathways. *J Reprod Immunol*, 83(1-2): 60-64.
- Tanaka M., Miyazaki T., Tanigaki S., Kasai K., Minegishi K., Miyakoshi K., Ishimoto H., Yoshimura Y. 2000. Participation of reactive oxygen species in PGF₂α-induced apoptosis in rat luteal cells. *J. Reprod. Fert.* 120: 239-245.
- Tomac J. 2011. Biology of the Corpus Luteum. *Periodicum Biologorum*, 113: 43-49.
- Ullery D.E., Miller E.R., Long C.H. 1965. Sheep hematology from birth to maturity. I. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. *J Anim Sci*, 24: 135-140.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 39: 44-84.
- Van Blerkom J., Antczak M., Schrader R. 1997. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod*, 12: 1047-1055.
- Van den Heuvel M.J., Chantakru S., Xuemei X., Evans S.S., Tekpetey F. 2005. Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest*, 34(3): 273-293.
- Van Langendonck A., Casanas-Roux F., Donnez J. 2002. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*, 77: 861-870.
- Van Voorhis, B.J., Dunn, M.S., Snyder, G.D., Weiner, C.P. 1994. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 135: 1799-1806.
- Vega M, Carrasco I, Castillo T, Troncoso JL, Videla LA, Devoto L. 1995. Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells. *J Endocrinol*, 147: 177-182.
- Vega M., Johnson M.C., Diaz H.A., Stocco C., Palomino A., Devoto L. 1998. Regulation of human luteal steroidogenesis in vitro by nitric oxide. *Endo*. 8: 185-191.
- Vázquez H.S.D., Miranda J.L., Segura L.O. Quero C A R. 2017. Desarrollo de folículos y cuerpo luteo en cabras, como respuesta al suministro de selenio. *Agroproductividad*, 10(2): 15-18.
- Wall P.D., Pressman E.K., Woods J.R Jr. 2002. Preterm premature rupture of the membranes and antioxidants: the free radical connection. *J Perinat Med*, 30: 447-457.
- Winslow R.M., Swenberg M.L., Benson J. 1989. Gas exchange properties of goat hemoglobins A and C. *J Biol Chem* 264: 4812-4817.
- Wink D.A., Osawa Y., Darbyshire J.F., Jones C.R., Eshenaur S.C., Nims R.W. 1993. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 115-123.
- Wu X.M., Sawada M., Carlson J.C. 1992. Stimulation of phospholipase A2 by xanthine oxidase in the rat corpus luteum. *Biol. Reprod*, 47: 1053-1058.
- Yie S.M., Xiao R., Librach C.L. 2006. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod*, 21(10): 2538-2544.

- Yue Wenbin, Zhang Chunxiang, Shi Liguang, Ren Youshe, Jiang Yusuo y Kleemann. 2009. Effect of supplemental selenomethionine on growth performance and serum antioxidant status in taihang black goats. *Asian Aust. J. Anim. Sci*, 3: 365-370.
- Zangar R.C., Davydov D.R., Verma S. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 199: 316-331.
- Zeller J.M., Henig I., Radwanska E., Dmowski W.P. 1987. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 13: 78-82.
- Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. 2006. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757: 509-517.