

11674



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

## **MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DESARROLLO DE UN BOLO INTRARRUMINAL DE LIBERACIÓN  
PROLONGADA CON SELENIO ORGÁNICO DE LEVADURAS  
PARA BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

**MIRIAM SARABIA MARTÍNEZ**

**TUTOR: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. MAXIMINO HUERTA BRAVO**

**DR. RENÉ ROSILES MARTÍNEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

OFICIO/FES-C/CGPMYDCPySA/ST/CGEP/1013/XII/2003

ASUNTO: Designación de Jurado.

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE  
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DE POSGRADO  
DE LA DIRECCION GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR  
Presente.

El Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal autoriza a la alumna MIRIAM SARABIA MARTINEZ, registrada con el número de cuenta 9656556-6, para presentar su examen de grado de la Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, con la tesis titulada "Desarrollo de un bolo intrarruminal de liberación prolongada con selenio orgánico de levaduras para bovinos productores de leche" a quien se le ha designado el siguiente jurado:

Presidente:	DR. RENE ROSILES MARTINEZ
Vocal:	DR. MAXIMINO HUERTA BRAVO
Secretario:	DR. ANTONIO DIAZ CRUZ
Primer Suplente:	DRA. OFELIA MORA IZAGUIRRE
Segundo Suplente:	DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 4 de diciembre del 2003.

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES  
COORDINADOR GENERAL

C.c.p. Exp. de alumno  
C.c.p. Archivo  
FSG/HRA/mrc

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Av. 1º de mayo S/N, Campo 1, Edificio de Estudios de Posgrado,  
Apartado Postal 25, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54700  
Tel.: 5623-2018, Fax: 5868 2489



## **A Dios**

Por iluminar mí camino, por haberme brindado la paciencia para concluir mis estudios de maestría, por la oportunidad de ver realizada otra de las metas importantes en mi vida y por el hermoso regalo que nos diste.

## **A mis padres, Eulalia y Filiberto**

### **A mis suegros, Martha y Juan**

Por todo su cariño y apoyo incondicional. Gracias se me hace insuficiente para valorar todo lo que han hecho por nosotros.

## **A mi hermano, Pablo**

Con mucho cariño y admiración. Es muy gratificante saber que también posees espíritu de lucha, no te detengas. Supérate y que esto te aliente a seguir adelante.

## **A mis grandes amores:**

### **Juan y Octavio Zabdiel**

Con amor y gratitud por formar parte de mi vida, por todo su cariño, enseñanzas y por los momentos que tuvimos que sacrificar para cumplir nuestros ideales. Gracias por ser el motor de mi vida.



# Agradecimientos

**A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM)** por darme la oportunidad de ingresar al posgrado y la formación profesional recibida.

**A los catedráticos del posgrado de la FES Cuautitlán y FMVZ** por haberme dado la oportunidad de aprender y de adquirir esta nueva formación profesional.

**A los miembros del jurado, Dr. René Rosiles Martínez, Dr. Maximino Huerta Bravo, Dr. Antonio Díaz Cruz, Dra. María Ofelia Mora Izaguirre y Dra. Raquel López Arellano** por el ejemplo a seguir que son para mí y por sus acertadas observaciones y valiosas aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

**Al Dr. Maximino Huerta Bravo** por su valioso apoyo para la realización del proyecto y sus no menos valiosas aportaciones.

**A la Dra. Raquel López Arellano y al D.A.R. Juan José Díaz Esquivel**, con admiración y gratitud, por confiar en mí, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto de investigación.

**A la Dra. Alma Revilla Vázquez** por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por sus aportaciones y sugerencias.

**Al M. en C. Armando Cervantes Sandoval** por su apoyo, sugerencias y comentarios.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca que me proporcionó para realizar mis estudios de maestría.

**A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP)** por el apoyo económico recibido para la realización del proyecto.

**Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la FES Cuautitlán, en especial al Técnico Rodolfo Robles Gómez y al Dr. Eliseo B. Hernández** por el tiempo y trabajo empleado para la preparación, observación de muestras y toma de fotografías.

**A los trabajadores de la Granja Experimental de la Universidad Autónoma de Chapingo** por todo su apoyo, especialmente a Pancho, Marco Polo y Jorge. No tengo palabras con que agradecerles. Muchísimas gracias por lo que me enseñaron.

**A la empresa Alltech de México, especialmente a la Gerente de Ventas Dra. Gladys Hoyos y a su secretaria la Srita. Monica Pilz por la donación de la levadura enriquecida con selenio así como por proporcionarme información relativa a su producto.**

**A la empresa BioTecAp S.A. de C.V. por la donación de selenio orgánico de levaduras.**

**A la empresa Farma Quimia S.A. de C. V. por la donación del Trióxido de Bismuto.**

**A la empresa Becton–Dickinson por la donación de tubos Vacutainer® y agujas estériles.**

**Al M. en C. Alfredo Cuellar Ordaz, M.V.Z. Javier Hernández Balderas y Dr. Fernando Osnaya Gallardo por las facilidades otorgadas para conseguir los animales requeridos para la segunda parte del proyecto.**

**A los productores del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, S.A. (CAITSA) en el estado de Hidalgo por su ayuda e invaluable apoyo, especialmente a:**

- **M.V.Z. Kaleb Al–Raschid García Garduño por la oportunidad y la confianza que me brindó para la utilización de sus vacas además de las facilidades otorgadas durante la realización de este experimento.**
- **A la Srita. Nelly Pineda y a Sr. Nicolás Hernández Hernández, trabajadores del establo #210 por todo su apoyo y colaboración para el manejo de los animales.**
- **Al M.V.Z. Rafael Soto Castor y a los Técnicos en Sanidad: José María Casasola Ramírez, Isaac Jiménez B. y Omar Jiménez por su invaluable apoyo en la toma de muestras a los animales.**

**A la Q.F.B. Maria Eugenia Gleason Huerta, a la pQ.F.B. Elivet Hernández y a la pQ.F.B. Nancy Hernández por su valiosísima colaboración y consejos además de todo el apoyo recibido para el análisis de las muestras de plasma y por compartir sus experiencias conmigo.**

**A las Q.F.B.'s Claudia Mariano, Adriana Morales, Araceli Guerrero, Guadalupe Álvarez así como a la Secretaria de la Sección de Tecnología Farmacéutica Tere Guzmán por su amistad y apoyo incondicional además de los gratos momentos que compartimos.**

PARA PODER ALCANZAR UN SUEÑO  
ES NECESARIO VERLO CON LOS OJOS  
DEL CORAZÓN, DEL ESPÍRITU  
Y COMENZARLO A CONSTRUIR.

NO IMPORTANDO QUE ESTE  
DESEO DE CONQUISTA  
ME LLEVE A IMAGINAR  
MI PROPIA MONTAÑA,

CREÁNDOLA...  
ASCENDIENDO POR ELLA  
CREYENDO EN ELLA

PARA LLEGAR A LA CIMA  
PUEDA VER MÁS ALLÁ,  
DE LO QUE AYER FUI  
Y DE LO QUE HOY SOY.

LOGRANDO CONVERTIR ESTE IDEAL  
EN UNA FUENTE DE LIBERTAD PROPIA,  
DONDE LA SATISFACCIÓN PERSONAL  
ASEGURE MI MÁS GRANDE ANHELO...

SER MEJOR

---

	Pág
Resumen	i
Introducción	1
1. Generalidades	3
2. Funciones del Selenio	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Actividad antioxidante	6
2.3. Sistema inmune	9
2.4. Hormonas	10
3. Fisiología y metabolismo del Selenio	11
3.1. Absorción	11
3.2. Transporte, distribución y almacenamiento	12
3.3. Excreción	13
3.4. Rutas propuestas para el metabolismo del Selenio	15
3.5. Factores que influyen sobre el metabolismo del Selenio	17
4. Disponibilidad del Selenio	20
4.1. Concentración de Selenio en el suelo	20
4.2. Compuestos de Selenio	22
5. Valores de referencia	23
6. Intoxicación por Selenio	25
6.1. Formas de intoxicación por Selenio	26
7. Deficiencia de Selenio	28

---

---

8. Métodos de suplementación	31
8.1. Antecedentes	31
8.2. Selenio orgánico	32
8.3. Parenteral	34
8.4. Bolos	34
8.5. Sales	36
8.6. Aplicación de Selenio en fertilizantes	37
9. Dispositivos de retención en rumen (RDD's)	37
9.1. Principios que gobiernan su diseño y funcionamiento	38
9.2. Razones para el éxito de los RDD's	42
9.3. Consideraciones regulatorias	42
10. Hipótesis	44
11. Objetivos	45
12. Material y métodos	46
12.1. Descripción del área de estudio	46
12.2. Alimentación de los animales en estudio	48
12.4. Descripción general de las fases de investigación	48
12.4.1. Fase 1. Estudio exploratorio	48
12.4.2. Fase 2. Estudio comparativo	51
13. Resultados y Discusión	55
13.1. Fase 1. Estudio exploratorio	55
13.2. Fase 2. Estudio comparativo	66
14. Conclusiones	78
15. Referencias	79
16. Anexos	97

---

## ÍNDICE DE CUADROS

	PÁG.
CUADRO 1 Formas químicas del selenio .....	5
CUADRO 2 Respuestas a Sel-Plex™ en la fisiología y producción de los animales para consumo .....	33

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
FIG. 1 Función antioxidante del selenio .....	7
FIG. 2 Rutas metabólicas del selenio .....	15
FIG. 3 Compuestos orgánicos de selenio.....	23
FIG. 4 Dimensiones de los bolos empleados en el estudio exploratorio .....	54
FIG. 5 Bolos oblongos al término de la prueba de disolución en agua a 37°C.....	57
FIG. 6 Superficie de los bolos al término de la prueba de disolución.....	58
FIG. 7 Interior del bolo al término de la prueba de disolución.....	59
FIG. 8 Efecto de la administración de un bolo intrarruminal de liberación prolongada con una dosis de 9.5 mg de selenio como selenio orgánico (levinact®) sobre la concentración de selenio en plasma de bovinos lecheros .....	61
FIG. 9 Efecto de la administración del bolo intrarruminal de liberación prolongada con una dosis de 9.5 mg de selenio como selenio orgánico (Levinact®) sobre la actividad de la GSH-Px en plasma de bovinos lecheros.....	63



---

FIG. 10 Correlación entre la concentración de selenio (ng/mL) y la actividad de la GSH-Px (nmoles NADPH ox/min*mL plasma) en plasma de bovinos lecheros después de 35 días de tratamiento	65
FIG. 11 Efecto de la administración de bolos intrarruminales de liberación prolongada con dosis de 11.4 mg de selenio como selenio orgánico (Sel-Plex™) y 23.8 mg de selenio como selenio inorgánico (selenito de sodio) sobre la concentración de selenio en plasma de bovinos lecheros.	69
FIG. 12 Efecto de la administración de bolos intrarruminales de liberación prolongada con dosis de 11.4 mg de selenio como selenio orgánico (Sel-Plex™) y 23.8 mg de selenio como selenio inorgánico (selenito de sodio) sobre la actividad de la GSH-Px en plasma de bovinos lecheros.	74
FIG. 13 Correlación entre la concentración de selenio (ng/mL) y la actividad de la GSH-Px (nmoles NADPH ox/min*mL plasma) en plasma de bovinos lecheros después de 56 días de tratamiento (bolo con selenito)	76
FIG. 14 Correlación entre la concentración de selenio (ng/mL) y la actividad de la GSH-Px (nmoles NADPH ox/min*mL plasma) en plasma de bovinos lecheros después de 56 días de tratamiento (bolo con Sel-Plex™)	77

---

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.
TABLA 1 Concentraciones esperadas de selenio en suero sanguíneo .....	24
TABLA 2 Enfermedades relacionadas a la deficiencia de selenio .....	29
TALA 3 Dieta proporcionada a los animales del estudio exploratorio .....	47
TABLA 4 Formulación bolos con Levinact® .....	54
TABLA 5 Concentración de selenio en plasma (ng/ml) de vacas Holstein tras la administración de un bolo intrarruminal con selenio orgánico de levaduras .....	61
TABLA 6 Actividad de la enzima gsh-px (nmoles nadph ox/min*ml plasma) de vacas holstein tras la administración de un bolo intrarruminal con selenio orgánico de levaduras .....	64
TABLA 7 Contenido total de selenio de las levaduras enriquecidas .....	66
TABLA 8 Formulación de los bolos con Sel-Plex™ .....	67
TABLA 9 Formulación de los bolos con Selenito .....	67
TABLA 10 Concentración de selenio (ng/ml) en plasma de vacas holstein bajo diferentes fuentes de suplementación de selenio .....	71
TABLA 11 Actividad de la GSH-Px (nmoles NADPH ox/min*mL plasma) de vacas Holstein bajo diferentes fuentes de suplementación de selenio.....	75

**Resumen**

---

## DESARROLLO DE UN BOLO INTRA-RUMINAL DE LIBERACIÓN PROLONGADA CON SELENIO ORGÁNICO DE LEVADURAS PARA BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE

### RESUMEN

Se estudió el efecto de la administración de un bolo intra-ruminal con selenio orgánico de levaduras sobre el estatus de dicho mineral así como sobre la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) en plasma de bovinos productores de leche, en 2 experimentos. El primer experimento se realizó con dos grupos de 10 vacas Holstein cada uno, de 500 Kg de peso en promedio, mantenidas en corrales. Los grupos experimentales fueron: Testigo (10 animales) y grupo con bolo que contenía 14.5% de levaduras enriquecidas con selenio, equivalente a 9.50 mg de selenio. Se determinó la actividad de la GSH-Px y la concentración de selenio en el plasma. Los resultados mostraron que las vacas que recibieron el selenio suplementario tuvieron mayores concentraciones de selenio en comparación con las vacas testigo ( $P < 0.05$ ) por tanto el selenio orgánico es una buena opción de suplementación para mantener las concentraciones de selenio en plasma en los niveles adecuados. En cuanto a la actividad de la GSH-Px no hubo efecto de la dosis de selenio administrada en el bolo sobre la actividad de la enzima ( $P > 0.05$ ) y hubo una correlación lineal pequeña y no significativa ( $r = 0.17$ ;  $P > 0.05$ ) entre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-Px, ambos en plasma. En el segundo experimento se emplearon 30 vacas Holstein, en el último tercio del periodo de gestación, de 550 Kg de peso en promedio, distribuidas en 3 grupos, mantenidos en corrales. Los grupos experimentales fueron: Testigo (10 animales); grupo con bolo con 34.5% de levaduras enriquecidas con selenio, equivalente a 11.42 mg de selenio, (10 animales); grupo con bolo con 0.17% de selenito de sodio, equivalente a 23.75 mg de selenio, (10 animales). Se midió la actividad de la GSH-Px y la concentración de selenio en el plasma encontrándose que los animales suplementados tuvieron concentraciones de selenio en plasma similares a los animales no suplementados ( $P > 0.05$ ), no obstante los animales a los que se les administró el selenio orgánico (Sel-Plex™) tuvieron concentraciones de selenio mayores que las de los animales con selenito de sodio ( $P < 0.05$ ) aún cuando el bolo con selenito de sodio contenía 108% más selenio que el bolo con selenio orgánico. Por otro lado, no hubo efecto del selenio del bolo sobre la actividad de la enzima en plasma ( $P > 0.05$ ) lo que se

atribuye a que los animales estaban en el último tercio del periodo de gestación donde el estrés fisiológico es significativo. Finalmente, no existe correlación significativa entre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-PX, ambos en plasma. En el caso del grupo de animales con el bolo con selenito de sodio el valor del coeficiente de Pearson fue  $r = 0.014$  ( $P > 0.05$ ) y para el grupo de animales con el bolo con Sel-Plex™,  $r = -0.08$  ( $P > 0.05$ ). Según estos resultados, la formulación desarrollada es adecuada para la fabricación de bolos de liberación prolongada con selenio orgánico o selenio inorgánico; el bolo administrado intraruminalmente, a bovinos productores de leche, en el último tercio del periodo de gestación, es efectivo para mantener las concentraciones de selenio en plasma en el rango considerado como adecuado; los bolos con selenito de sodio son tan efectivos como los bolos con selenio de levaduras para mantener las concentraciones de selenio en plasma pero con una cantidad 108% mayor de selenio con respecto al selenio orgánico; y, finalmente, no existe correlación ente la concentración de selenio y la actividad de la enzima GSH-Px en plasma en animales en el último tercio del periodo de gestación estabuladas.

**Palabras clave:** Selenio, levaduras, vacas lecheras, glutatión peroxidasa, bolo

# **Introduccion**

## Introducción

El selenio es un elemento traza esencial para los humanos y los animales ya que es incorporado dentro de la molécula de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) la cual es vital para proteger a los glóbulos rojos y membranas celulares contra las reacciones indeseables con peróxidos solubles que se acumulan en los tejidos. Este mineral también previene la enfermedad del músculo blanco (distrofia muscular nutricional) y mejora el crecimiento de los animales jóvenes y el desempeño reproductivo de los animales maduros. También, se sabe que disminuye la incidencia de mastitis y metritis en el ganado y mejora la respuesta inmune en ovejas (Serra, 1994).

La deficiencia de este mineral ocasiona problemas de salud graves tanto en el humano como en los animales. En las vacas lecheras la deficiencia de selenio puede manifestarse en muerte embrionaria, neonatos débiles, disminución de la resistencia a la enfermedad, enfermedad de músculo blanco, alta incidencia de mastitis y retención de placenta así como desórdenes de la fertilidad. Algunas de estas enfermedades afectan al ganado en varias regiones del centro y norte de la república mexicana.

Las tierras deficientes en selenio, las prácticas modernas de fertilización y la expansión de las lluvias ácidas han reducido la cantidad de selenio en los alimentos. Por ello es necesario hacer uso de suplementos minerales que cubran los requerimientos de los animales para un mantenimiento y producción animal adecuados (Wyatt, 1996).

Existen diferentes maneras de suplementar selenio<sup>1</sup>, a saber: soluciones estériles para inyección hipodérmica, premezclas minerales añadidas en el alimento, adición de selenio al agua de beber, suplementación de los fertilizantes antes o durante la siembra, la preparación de suplementos minerales en saladeros a libre acceso. Sin embargo,

---

<sup>1</sup> El selenio se ha administrado como selenito de sodio, selenato de calcio, selenato de bario y selenio en estado elemental, generalmente mezclados con sales de hierro en proporción 1:9 (Rosiles, 1998).

siempre se busca un método que pueda dosificar con precisión, reducir la frecuencia del tratamiento y mano de obra para el manejo de los animales, que sea eficiente, que disminuya la incidencia del trauma al animal y además que ofrezca disponibilidad por periodos prolongados. Un ejemplo de esto último es el empleo de bolos ruminales, de liberación lenta los cuales han sido utilizados en varias partes del mundo para suplementar al ganado en pastoreo y se ha demostrado que aumentan las concentraciones de selenio en sangre e hígado y los niveles de la glutatión peroxidasa en bovinos y borregos (Ammerman, 1995; Hidioglou, 1987; Donald, 1993; Rosiles, 1998; Millar, 1988; Swecker, 1989).

En este trabajo se desarrolló un bolo de retención en rumen para la suplementación de selenio orgánico en bovinos productores de leche. Esto debido a tres razones principales: primero, se ha encontrado que los compuestos orgánicos de selenio son más biodisponibles que las formas inorgánicas de selenio; segundo, las formas farmacéuticas que se han desarrollado anteriormente son a base de selenio inorgánico y, tercero; los productos veterinarios disponibles comercialmente, al menos en México, no incluyen formas farmacéuticas para la administración intraruminal del selenio orgánico.



**Marco Teorico**

## 1. Generalidades

La incorporación de los elementos minerales traza es requerida en las dietas de todos los animales para el mantenimiento de la salud, crecimiento y un sinnúmero de funciones bioquímicas y fisiológicas. Entre estos elementos traza esenciales se encuentra el selenio. El selenio fue descubierto en 1817 por Berzelius, en Estocolmo, Suecia, pero el significado biológico de este elemento no fue reconocido hasta que fue identificado como el agente tóxico asociado con la enfermedad alcalina, actualmente denominada selenosis, causada por el consumo de plantas en los territorios de Dakota y Wyoming en los Estados Unidos, en 1856. En 1957, Schwartz y Foltz reportaron que el selenio era un nutriente traza esencial, y los nutricionistas, a partir de allí iniciaron estudios extensivos para descubrir la función metabólica de este elemento y documentar las consecuencias de su deficiencia en alimentos para animales y humanos (citado por Edens, 2002).

El selenio (Se), tiene propiedades metálicas y no metálicas, existe en varias formas alotrópicas (rojo amorfo o vítreo, rojo cristalino, gris metálico y el selenio negro, que es la variedad metálica, en estado muy fino de subdivisión). Está relacionado con el oxígeno, el azufre y el telurio, con los que forma el grupo VI-A de la tabla periódica. Tiene un peso atómico de 78.96 y número atómico 34.

En el orden de abundancia de los elementos, ocupa el sexagésimo noveno lugar, es pues un elemento bastante escaso ya que su contenido en la corteza terrestre es de 0.09 partes por millón (ppm). Se encuentra en cantidades muy pequeñas pero detectables en todos los suelos, tanto forestales como agrícolas.

El selenio existe en varios estados de oxidación de significancia biológica: seleniuro ( $\text{Se}^{-2}$ ), selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ) y selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ). Cabe mencionar que las formas de selenio utilizadas en los suplementos alimenticios están principalmente en los estados más elevados de oxidación, mientras que las formas químicas de selenio

presentes en plantas y de importancia en nutrición y bioquímica contienen selenio en forma reducida (Anzola, 2001; Combs, 1986).

Los complejos de selenio orgánico y los aminoácidos que contienen selenio son considerados los más biodisponibles<sup>2</sup>. El selenio en las levaduras está generalmente en forma de selenometionina, donde el selenio reemplaza al azufre en la molécula de metionina (Combs, 1986)

## 2. Funciones del selenio

### 2.1. Antecedentes

El selenio es un nutriente esencial pero también tóxico que se encuentra en forma orgánica e inorgánica.

Su función fisiológica se descubrió en 1973. Dichas funciones biológicas están mediadas a través de al menos 13 selenoproteínas<sup>3</sup> como selenocisteína (Se-cyst). La síntesis endógena de este aminoácido a partir del selenio inorgánico (selenuro, Se<sup>-2</sup>) y serina está codificada por un codón de terminación UGA en mRNA e involucra un tRNA único.

La analogía química entre el azufre y el selenio es de gran importancia desde el punto de vista biológico, ya que el selenio puede reemplazar al azufre en los aminoácidos, glucósidos, glutatión, tiamina y otros compuestos a los que da carácter tóxico. Un ejemplo de ello es la sustitución del azufre por selenio en la metionina para formar un análogo, selenometionina (Se-met), que es la principal forma de selenio encontrada en los alimentos. Los animales no pueden sintetizar Se-met o distinguirla de la metionina y por

---

<sup>2</sup> La biodisponibilidad del selenio a partir de la selenometionina es mayor al 90% (Swanson et al., 1991)

<sup>3</sup> Una selenoproteína es una proteína que contiene selenio en cantidades estequiométricas.

Cuadro 1. Formas químicas del selenio (adaptado de Combs and Combs, 1986)

**COMPUESTOS DE SELENIO DE IMPORTANCIA EN NUTRICIÓN**

	<b>ESTADO DE OXIDACIÓN</b>	<b>EJEMPLO</b>
MAS REDUCIDO	$\text{Se}^{-2}$ SELENUROS	SELENOMETIONINA SELENOCISTEINA
↓	$\text{Se}^0$ SELENIO ELEMENTAL	SELENIO AMORFO SELENIO ROJO SELENIO GRIS
	$\text{Se}^{+4}$ SELENITO	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ SELENITO DE SODIO
MAS OXIDADO	$\text{Se}^{+6}$ SELENATO	$\text{Na}_2\text{SeO}_4$ SELENATO DE SODIO

ello es incorporada de manera no específica en una amplia variedad de proteínas que contienen selenio. Hudman y Glenn (1984) encontraron que *Selenomonas ruminantium*, un microorganismo ruminal, tiene la capacidad de incorporar selenito-<sup>75</sup>[Se] dentro de los aminoácidos azufrados en lugar del azufre. Posiblemente este Selenio esté ligado fuertemente ya que no es completamente disponible para el animal. Además, *S. ruminantium* tiene la capacidad para reducir el selenito a selenio rojo elemental, el cual no puede ser utilizado por el rumiante.

Se ha estimado que hay entre 50 y 100 diferentes selenoproteínas en el cuerpo humano, incluyendo las que forman parte del músculo cardíaco, eritrocitos y esperma. A la fecha, se han caracterizado 14 selenoproteínas en mamíferos y que están asociadas con particulares actividades bioquímicas y fisiológicas: 4 glutatión peroxidasas (citósólica, gastrointestinal, extracelular o plasmática e hidroperóxido fosfolípido), selenoproteína P, selenoproteína W, 3 iodotironina deiodinasas (Tipo I, Tipo II y Tipo III), 2 tioredoxina reductasas (citósólica y mitocondrial), selenoproteína de la cápsula mitocondrial de los espermatozoides de mamíferos la cual podría tener una función estructural y una isoforma de la selenofosfato sintetasa que participa en el metabolismo del selenio. Así, las funciones biológicas conocidas del selenio incluyen, defensa contra el daño oxidativo, regulación de las hormonas tiroideas y regulación del estado redox de la vitamina C y otras moléculas (Daniels, 1996; Levander, 1986; Anzola, 2001).

## **2.2. Actividad antioxidante**

La oxidación durante el metabolismo normal celular lleva a la formación de radicales libres, como los que derivan del oxígeno molecular. El cobre y el hierro proporcionan electrones al oxígeno molecular, produciendo más de una especie de radicales con diversas reactividades; el radical hidroxilo es una de las especies más

reactivas (Fig. 1). Los radicales libres dañan las estructuras celulares y en consecuencia, interfieren con las funciones de las enzimas y otras macromoléculas. El daño en los lípidos de la membrana forma poros en ésta, permitiendo que algunas sustancias, como el  $\text{Ca}^{2+}$ , difundan hacia el medio intracelular.

Las células animales y humanas han desarrollado ciertos mecanismos de defensa que les proporcionen protección contra el daño oxidativo inducido por los radicales libres. Ciertos agentes (selenio, vitamina E, C y  $\beta$ -caroteno) pueden eliminar los radicales libres; ciertas enzimas son capaces de inactivar a los radicales libres. Ejemplos representativos son: superóxido dismutasa, que está presente en la mitocondria; la glutatión peroxidasa (GSH-Px) que es una enzima que contiene selenio y cataliza la degradación de peróxidos de hidrógeno y peróxidos lípidos; y, la catalasa que es una enzima que contiene hierro y se ha encontrado en los peroxisomas (Combs, 1986; El-Bayoumy, 2001).

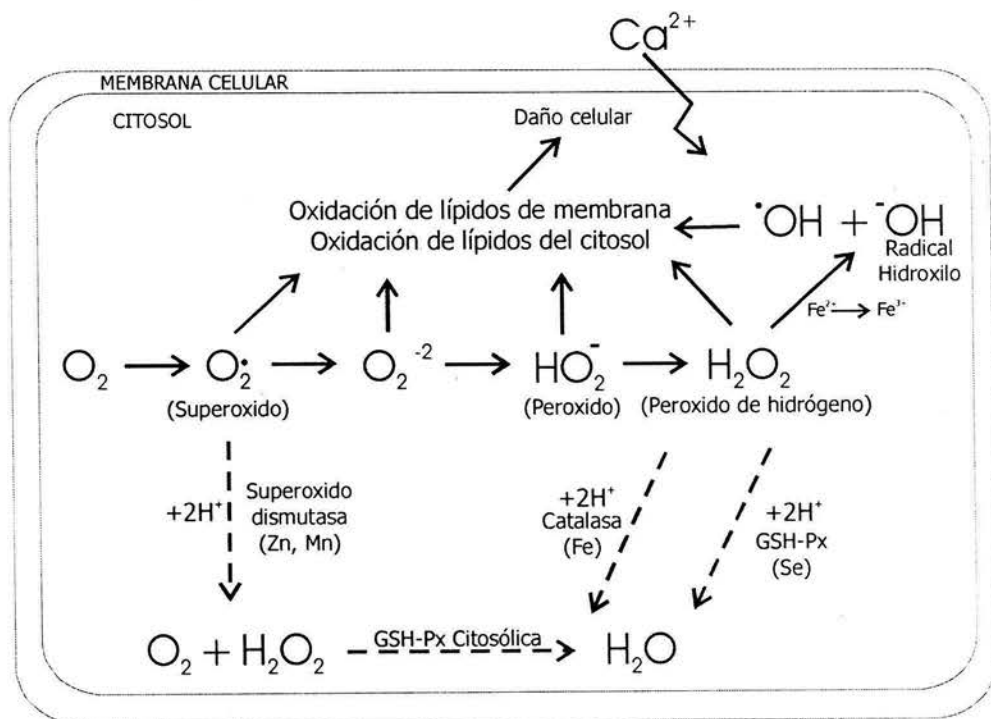


Fig. 1. Función antioxidante del selenio (Combs, 1986).

Como se mencionó anteriormente, el selenio forma parte de una enzima, la GSH-Px, en la cual se encuentra en forma de selenocisteína. Esta enzima se reconoce generalmente por su función antioxidante. Hay diferentes formas de esta enzima, las cuales funcionan en diferentes sitios (citoplasmática, plasmática, intestinal, pulmonar e hidropéroxido fosfolípido), cada una quizá con especificidad al sistema antioxidante necesitado por este tejido. El hidropéroxido fosfolípido GSH-Px parece estar involucrado en la actividad antioxidante a nivel de la membrana celular, mientras que la GSH-Px citoplasmática se asocia con actividad antioxidante dentro del citoplasma celular. La distribución de los tipos GSH-Px difiere por tejido y por especie, consecuentemente los signos clínicos de deficiencia de las especies animales podrían reflejar diferentes distribuciones de los sistemas antioxidantes GSH-Px en estas especies (citado por Valladares, 2001).

La GSH-Px asegura la destrucción del peróxido de hidrógeno que se forma en las reacciones oxidativas respiratorias y que es tóxico. Sin tal eliminación, las células musculares, pancreáticas y hepáticas y los eritrocitos de la sangre serían destruidos con rapidez. Esta acción protectora explica los signos de la carencia de selenio.

En los eritrocitos se encuentra la mayor cantidad de GSH-Px, lo cual depende de la utilización del selenio; del curso de su desarrollo, velocidad de eritropoyesis y desaparición de éstas células.

El selenio es un antioxidante como la vitamina E la cual previene la formación de peróxidos grasos por secuestro de radicales libres antes de que ellos inicien la peroxidación grasa. En tanto que la vitamina E es liposoluble, lo cual limita y hace más lenta su acción, el selenio es soluble en agua y, como consecuencia, por lo menos mil veces más activo que la vitamina E (Passwater, 1999; Valladares, 2001).

### 2.3. Sistema inmune

El selenio es importante para mantener la resistencia a la enfermedad. Las relaciones conocidas entre el selenio y la función inmune incluyen la efectividad de las células fagocíticas para “matar” a los microorganismos patógenos (inmunidad no específica), niveles de IgG en el calostro (inmunidad humoral) y la función de las células T (inmunidad celular).

El reporte de varios estudios indica que la deficiencia de selenio puede ser responsable de alterar la respuesta inmune, reduciendo la capacidad de los animales para responder ante desafíos antigénicos, por el efecto depresivo en la síntesis de anticuerpos neutralizantes (Swecker, 1995; Awadeh, 1998; Valladares, 2001)

Cuando existe deficiencia de selenio, los niveles plasmáticos de los peróxidos se incrementan rápidamente, causando daño en los endotelios capilares, eritrocitos y células plasmáticas modificando el estado homeostático celular al dañar la actividad metabólica de la membrana, lo que se relaciona con la reducción de títulos de anticuerpos, reflejando una inmunosupresión; así, la deficiencia de selenio reduce significativamente la respuesta inmune humoral y la función inmune no específica.

La deficiencia de selenio y vitamina E, predispone una baja actividad de la GSH-Px, por lo tanto, una disminución en la concentración de inmunoglobulinas, baja actividad fagocitaria y mayor destrucción de los macrófagos. (Swecker, 1995; Awadeh, 1998; Valladares, 2001)

Boyne y Arthur (1986) reportaron que los neutrófilos de becerros con deficiencia de selenio tenían una menor capacidad para “matar” a *Candida albicans* comparada con los neutrófilos de animales suplementados con selenio. Los autores indican que la disminución en la efectividad de los neutrófilos está relacionada con la actividad reducida de la GSH-Px resultado de la deficiencia de selenio.



## 2.4. Hormonas

Se han identificado tres selenoproteínas (iodotironina deiodinasas) que regulan la conversión de tiroxina (T4) a la forma activa T3 (3,3',5-triiodotironina) o a la forma inactiva rT3 (triiodotironina inversa). La deiodinasa tipo I (IDI) está expresada en el hígado, riñón, cerebro, pituitaria y tejido adiposo café de los rumiantes. La deiodinasa tipo II (IDII) se encuentra en el cerebro y pituitaria de todas las especies y en el tejido adiposo de humanos. La deiodinasa tipo II (IDII) cataliza la conversión de T4 a T3 dentro de los tejidos que no pueden utilizar la T3 circulante. La deiodinasa tipo III (IDIII) convierte T4 a rT3 y T3 a diiodotironina, se encuentra en el cerebro, piel y placenta. El papel del selenio en las iodotironina deiodinasas implica que algunas consecuencias de la deficiencia de selenio se atribuyan directamente a trastornos en el metabolismo de las hormonas tiroideas.

En la deficiencia de selenio, la estimulación de la hormona plasmática tiroidea (TSH) y los niveles de T4 se encontraron aumentados, mientras que la T3 plasmática disminuyó su concentración. La actividad reducida de la hormona tiroidea explica el por qué los animales deficientes de selenio crecen más lentamente (Anzola, 2001; Arthur, 1993).

Los animales adultos se adaptan a las bajas temperaturas gracias a la producción de calor estimulada por la tiroides. Esto tiene especial importancia para los terneros y corderos que nacen en los climas fríos. En estos animales el calor metabólico generado en el tejido adiposo café es la principal defensa contra el enfriamiento del cuerpo después del nacimiento y ayuda a los neonatos a sobrevivir durante las primeras semanas de vida. El tejido adiposo café, bajo la influencia de la T3 producida localmente incrementa la producción de una proteína no acoplada esencial para la termogénesis. Una disminución en la actividad de IDI reducirá los niveles de T3, limita la producción de calor y hace a los terneros y corderos susceptibles al estrés por frío. (Bligh, 1984; Arthur, 1993)

### 3. Fisiología y metabolismo del selenio

#### 3.1. Absorción

La literatura sobre la eficiencia de la absorción de selenio no es muy extensa para el caso de los rumiantes. La extrapolación de datos obtenidos de no rumiantes debe hacerse con precaución debido al extenso metabolismo ruminal del selenio. La digestibilidad aparente del selenio en forrajes y concentrados está entre el 30 y el 60% para ovejas, cabras y vacas lecheras no lactantes. Datos limitados sugieren que la digestibilidad verdadera del selenio a partir de los alimentos está entre 40 y 65% para rumiantes. El selenio del selenito de sodio, selenato de sodio y selenio de levaduras tienen digestibilidades aparentes para rumiantes en el rango del 40 al 50%, pero en otro estudio realizado se encontró que la digestibilidad aparente del selenio a partir del selenito de sodio administrado a vacas lecheras, fue menor al 4%.

La absorción de selenio es significativamente más baja en rumiantes que en animales monogástricos (del 29 al 35% en rumiantes y del 77 al 85% en monogástricos cuando es administrado como selenito por vía oral). El principal sitio de absorción de selenio es en el duodeno. No se absorbe en el rumen o abomaso de las ovejas ni en el estómago del cerdo. La cantidad absorbida depende de la forma química en la cual es ingerido el selenio. La diferencia de absorción es debida a la mayor pérdida del elemento ocasionada por los microorganismos del rumen, que convierten una porción del selenio en formas insolubles (selenio elemental y seleniuros) y otra porción la incorporan a sus proteínas para la formación de algunos selenoaminoácidos como selenometionina y selenocistina (Harrison and Conrad, 1984a; Harrison and Conrad, 1984b; Hansard, 1983; Langlands, 1986; Combs et al., 1987).

### 3. 2. Transporte, distribución y almacenamiento

El transporte del selenito en bovinos involucra grupos sulfidrilo y el enlace del selenito a las proteínas del plasma depende de la presencia de los eritrocitos. El enlace del selenio a las proteínas del plasma no es energía-dependiente y no requiere síntesis de proteínas (Porter et al., 1979). Según los resultados obtenidos por Symonds et al (1981), el hígado de los bovinos remueve rápidamente aproximadamente el 40% del  $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_3$  a partir del plasma, éste se enlaza a componentes del plasma y una hora después de la inyección es liberado a la circulación.

La selenometionina es transportada activamente por el mismo sistema de transporte de la metionina, como podría esperarse debido a que el selenio y el azufre son virtualmente idénticos en cuanto a radio covalente se refiere, así que estas especies no pueden ser distinguidas por las enzimas participantes. De igual manera, el selenato se absorbe activamente y depende del gradiente de sodio mantenido por la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPasa}$ . En contraste, la selenocisteína y el selenito no son transportados activamente y su absorción no está inhibida por el correspondiente análogo azufrado.

En resumen, se sabe muy poco acerca de los mecanismos de transporte específicos para selenio involucrados en la absorción de la selenocisteína y del selenito en el intestino, pero es claro que la forma de selenio en la dieta tiene un impacto mínimo sobre la absorción de selenio bajo condiciones normales.

El selenio se incorpora a las células rojas sanguíneas<sup>4</sup>, leucocitos, mioglobina, nucleoproteínas, miosina y varias enzimas, que incluyen el citocromo c y la aldolasa. Asimismo, el selenio también penetra a todos los tejidos donde se almacena

---

<sup>4</sup> Cerca del 70% del selenio en la sangre completa está en los eritrocitos. En ganado, cerca de una tercera parte del selenio en los eritrocitos está en forma de GSH-Px y el resto, enlazado a la hemoglobina. (Kincaid, 1995).

principalmente como selenometionina<sup>5</sup> y selenocistina (Sunde, 1997; De Blas, 1986; Church, 1992).

La transferencia placentaria de selenio es muy amplia en todas las especies, lo que se demostró al prevenir la distrofia muscular en los corderos y en los terneros al suministrarle selenio a la madre preñada y a través de estudios de rastreo radioactivo. La selenometionina se transfiere mucho más fácilmente al feto que el selenio inorgánico.

La distribución del selenio en varios tejidos animales ha sido reportada por varios investigadores. Con la dosis de selenio requerida en la dieta, los riñones contienen la más alta concentración de selenio, seguidos por el hígado y otros tejidos glandulares tales como el bazo y el páncreas. Los tejidos intestinales y pulmonares tienen concentraciones relativamente elevadas. El músculo cardíaco contiene apreciablemente más selenio que el músculo esquelético. La lana y el pelo podrían tener concentraciones relativamente elevadas, pero el tejido nervioso tiene bajas concentraciones (Sunde, 1997; De Blas, 1986; Church, 1992).

### 3.3. Excreción

El selenio tisular es relativamente lábil tal como se demuestra por su pérdida rápida de los tejidos animales alimentados con dietas bajas en selenio después de consumir dietas ricas en ese mineral. Las pérdidas se efectúan a través de los pulmones<sup>6</sup>,

---

<sup>5</sup> Los productos ricos en selenometionina tienen la ventaja de servir como "reservorios" de selenio en comparación con las fuentes inorgánicas de selenio que son rápidamente eliminadas del organismo, de ahí que, en el caso del selenio orgánico de levaduras, éste sea retenido más efectivamente en el músculo, leche y tejidos fetales, que el selenio inorgánico. Las reservas de selenio son necesarias para mantener los niveles adecuados de las selenoproteínas que están involucradas en el metabolismo, la salud y la fertilidad (Power, 2000).

<sup>6</sup> La eliminación del selenio por los pulmones sólo ocurre en los casos de toxicidad. La forma química de selenio que se excreta por los pulmones es el dimetilselenuro (Jackson, 1987).

heces<sup>7</sup> y orina<sup>8</sup>. La velocidad de excreción así como las cantidades relativas que pueden excretarse por cada vía dependen de la vía de administración, la dosis, los niveles tisulares y la especie animal.

En las ovejas, el selenio inyectado se excreta principalmente por la orina en una proporción equitativa a la administrada; la pérdida fecal es pequeña y es constante con el nivel de la dosificación; el selenio respiratorio es similar a la pérdida fecal a bajos niveles de administración, pero aumenta con el nivel de dosificación y excede a las pérdidas fecales varias veces con niveles elevados de dosificación.

El selenio que se administra por vía oral se excreta por las heces en mayor cantidad con bajos niveles de consumo. A medida que el consumo aumenta, las pérdidas fecales permanecen relativamente estables y el selenio respiratorio aumenta en forma constante; la pérdida urinaria aumenta con niveles moderados de complementación y luego desciende.

Las pérdidas fecales indican principalmente el selenio que no se absorbe pero también que se excreta a través de la bilis, del conducto pancreático y de las células mucosas intestinales. Se sabe que el arsénico reduce la absorción del selenio en el aparato digestivo, también aumenta la excreción del selenio biliar y urinario cuando se inyecta arsénico (Hill, 1987; Korening, 1991).

---

<sup>7</sup> El selenio excretado en heces por los rumiantes es insoluble, como selenio elemental o selenio reciclado en tracto gastrointestinal que no fue absorbido, resultando pequeñas cantidades disponibles para el consumo de las plantas.

<sup>8</sup> El selenio se elimina por orina en animales monogástricos cuando se administra por vía oral o parenteral y en rumiantes la mayor parte se excreta en heces y una pequeña cantidad en orina cuando es administrado por vía oral. La forma química de selenio que se excreta en la orina es el ion trimetilselenuro (Sunde, 1997; Jackson, 1987).

### 3.4. Rutas propuestas para el metabolismo del selenio

El azufre y el selenio tienen una química muy similar en relación a su radio covalente y la capacidad que presentan para utilizar enlaces múltiples  $d\pi-p\pi$ . El bajo potencial de reducción del azufre con respecto al selenio hacen que éste último tienda a ser reducido mientras que el azufre tiende a ser oxidado. Las rutas metabólicas específicas del selenio se muestran en la Figura 2 (Sunde, 1997).

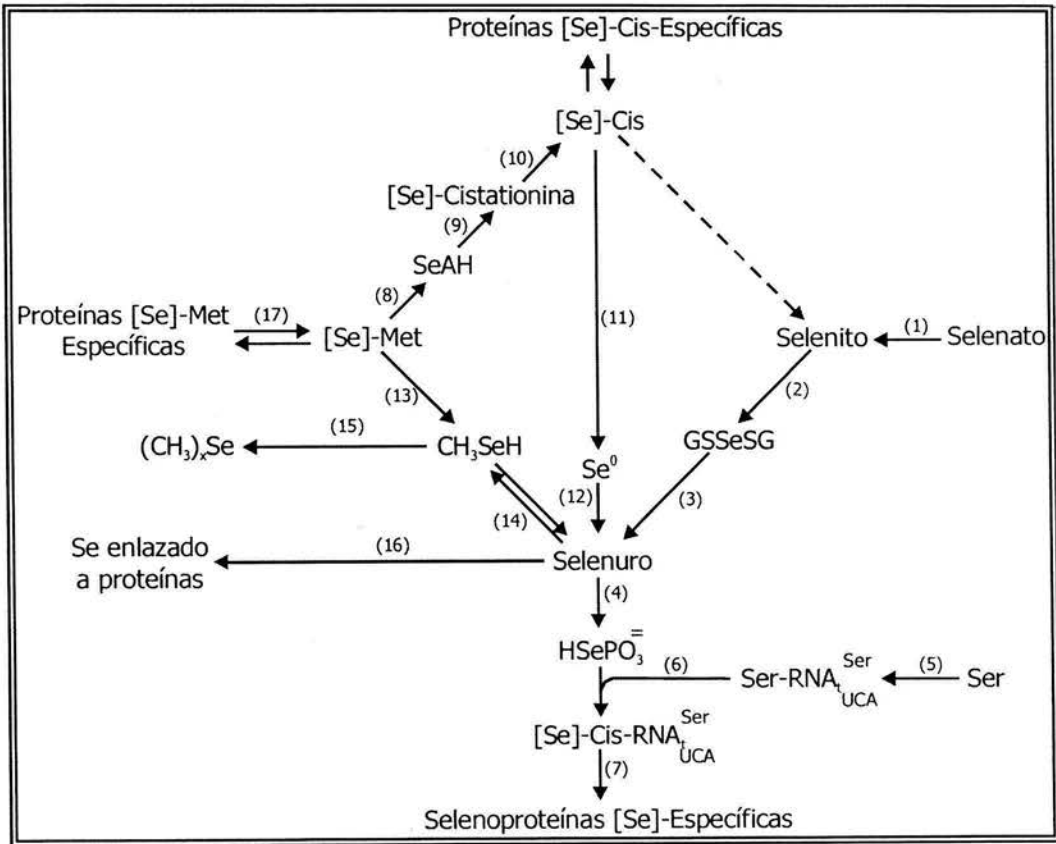


Fig. 2. Rutas metabólicas del selenio (Sunde, 1997).

1. Reducción del selenato a selenito, involucra los intermediarios activados APSe o PAPSe
2. Reducción no enzimática del selenito
3. Reducción catalizada por la glutatión reductasa
4. Selenofosfato sintetasa o el gen SELD
5. Seril-RNA<sub>t</sub> sintetasa
6. Selenocisteína sintetasa o el gen SELA
7. Inserción traduccional de selenocisteína, mediada por RNA<sub>t</sub><sup>Sec</sup> y el gen SELB a una posición especificada por el codón UGA
8. Transmetilación que resulta en la formación de Se-adenosil homocisteína (SeAH)
9. Cistationina-β-sintetasa
10. Cistationina-γ-liasa
11. Selenocisteína ligasa
12. Reducción no enzimática vía GSH
13. Transaminación que lleva a la formación de metano selenol
14. S-Metiltransferasa
15. Tioéter-S-metiltransferasa
16. Enlace hipotético del seleniuro a proteínas
17. Acilación de la selenometionina de RNA<sub>t</sub><sup>Met</sup> seguida por su incorporación en posiciones especificadas por un codón UGA
18. Incorporación de selenocisteína dentro de RNA<sub>t</sub><sup>Cis</sup> seguida por su incorporación en lugar de cisteína en codones UGU y UGC.

En resumen, la selenocisteína es sintetizada por un RNA<sub>t</sub> específicamente cargado (SelC) vía un selenofosfato rico en energía. La formación de un compuesto selenofosfato lábil está catalizada por una selenofosfato sintetasa (Seld). Se conocen dos formas de Seld

en mamíferos: una de ellas es una selenoproteína cuya actividad y expresión están directamente bajo control de la disponibilidad de selenio. La incorporación de la selenocisteína dentro de las proteínas está catalizada por selenocisteína-RNA<sub>t</sub>-sintetasa (Sela) para “apagar” a los codones UGA<sup>9</sup>, donde el selenocisteína-RNA<sub>t</sub><sup>ser (sec)</sup> actúa como un supresor de RNA's de transferencia. Sin embargo, para prevenir la terminación prematura en los codones UGA por la liberación de factores de elongación seleno específicos SelB se requiere en su lugar factores de elongación convencionales. SelB sólo ayuda en la incorporación de selenocisteína si en el contexto del codón UGA está presente un elemento Secis en la estructura secundaria del RNA<sub>m</sub>. Mientras que en procariontes esta estructura se localiza inmediatamente adyacente en la posición 3'- del codón UGA, este elemento podría tomar la posición de varios cientos de pares de bases alejado hacia abajo en la posición 3'-UTR del RNA<sub>m</sub> en eucariotas. El homólogo SelB en eucariotas no ha sido bien identificado aún, mientras que los otros factores (Sela, SelB, SelD) y su modo de acción son muy similares a los de procariontes. Este complejo sistema de síntesis de selenocisteína y su incorporación post-traduccional dentro de proteínas específicas indica un papel limitado del selenio en estas proteínas y sistemas enzimáticos pero proporciona una vía para el control de la expresión genética y función de este subgrupo de proteínas (Köhrle, 1999).

### 3.5. Factores que influyen sobre el metabolismo del selenio

Existen diversos factores que influyen en el metabolismo del selenio. Algunos de éstos factores son: la forma química del selenio, azufre, arsénico, microorganismos, vitamina E y la ingestión previa de selenio.

---

<sup>9</sup> Los codones UGA normalmente terminan el proceso de traducción.



### **Microorganismos del rumen**

Los microorganismos del rumen probablemente son los responsables de la absorción de selenio en rumiantes. Un gran porcentaje del selenio inorgánico de la dieta es reducido a formas insolubles por estos microorganismos y una dieta elevada en carbohidratos favorece esta conversión más que una dieta alta en forrajes (Whanger et al., 1968).

El selenio es reducido por los microorganismos ruminales durante el proceso de fermentación. Muchos reportes indican que los microorganismos ruminales son capaces de incorporar selenio dentro de sus células durante el crecimiento y también convierten el selenio a formas no disponibles como parte de un mecanismo de detoxificación. En un experimento in vitro, Serra y colaboradores (1997) encontraron que más del 40% del selenio es convertido a selenio insoluble cuando los microorganismos ruminales se incuban con selenito.

Aunque los microorganismos convierten una porción del selenio a formas insolubles, también lo incorporan dentro de las proteínas. Se ha demostrado que la selenometionina es incorporada dentro de las proteínas bacterianas cuando el fluido ruminal se ha incubado in vitro con este compuesto. Hidioglou y colaboradores (1968) caracterizaron los compuestos que contenían selenio marcado radioactivamente ( $^{75}\text{Se}$ ) en los microorganismos del rumen lo que reveló la presencia de  $^{75}\text{Se}$ -selenometionina después de la incubación con  $^{75}\text{Se}$ -selenito in vitro. Esto indica que los microorganismos del rumen tienen la capacidad de convertir el selenio inorgánico a compuestos orgánicos de selenio así como incorporar a éstos últimos dentro de las proteínas bacterianas (Paulson et al., 1968)

### **Influencia del azufre**

Los análogos azufrados de los compuestos de selenio tienen una gran influencia sobre el metabolismo del selenio. Aunque se ha mencionado que el azufre se relaciona con problemas de deficiencia de selenio, no hay reportes consistentes al respecto. Paulson et al (1966) encontró que hay poca diferencia en la captación de selenio en los tejidos cuando las ovejas lactantes son alimentadas con dietas que contienen entre 0.28 y 0.62% de azufre, cuando era dosificado intraruminalmente con selenato-Se<sup>75</sup>.

### **Influencia del arsénico**

Varias formas químicas de arsénico incluyendo algunos arsenicales orgánicos, son efectivos contra la intoxicación por selenio. Esto fue elucidado a partir de datos que mostraron que el arsénico aumenta la excreción biliar de selenio, lo que resulta en bajas concentraciones del mineral en los tejidos (Levander, 1977). En la situación contraria, también se ha demostrado que el selenio incrementa la excreción biliar de arsénico. Sin embargo, el arsénico no puede llevar a cabo las funciones metabólicas del selenio.

### **Ingestión previa de selenio**

La incorporación del selenio en las células bacterianas es muy rápida y éste es enlazado a las proteínas bacterianas una hora después de su administración. La amplia variación del contenido de selenio en los microorganismos ruminales es inversamente proporcional a la ingestión previa de Selenio por el animal.

De acuerdo a Mc Dowell (1992) el riñón y el hígado son los indicadores más sensibles del estado de selenio en el animal, mientras que el selenio y glutatión peroxidasa (GSH-Px) de la sangre son usados a menudo para propósitos de diagnóstico. Las concentraciones de selenio en plasma o suero reflejan más exactamente los niveles reales de suplementación y son más sensibles a los cambios en la suplementación a diferencia de la concentración de selenio en la sangre completa. Esta última refleja la suplementación previa o histórica debido a que el selenio (en GSH-PX) es incorporado dentro de los eritrocitos durante su formación.

### **Efectos de la Vitamina E**

Aunque se ha establecido que existe relación metabólica entre el selenio y la vitamina E (Hoekstra, 1975), niveles moderados de vitamina E no afectan el metabolismo del selenio. Sin embargo, dosis masivas de vitamina E aparentemente disminuyen la volatilización de selenio en ratas e incrementa la retención de selenio en el hígado y la canal. Además, aparentemente, el estatus de vitamina E del animal afecta el estado de oxidación del selenio en los tejidos (Diplock et al, 1973)

## **4. Disponibilidad del selenio**

### **4.1. Concentraciones de selenio en suelo**

A nivel mundial se pueden encontrar suelos con alto o escaso contenido de selenio, esto provoca que los animales que habitan en estas regiones tengan un suministro variable y presenten enfermedades por carencia o por exceso.

El selenio está amplia pero variablemente distribuido en la corteza de la tierra, con una abundancia promedio de cerca de 0.4 ppm. La concentración de selenio en la mayoría de los suelos oscila entre 0.1 y 2 ppm. La mayoría de los suelos seleníferos contienen en promedio no más de 2 ppm con características de ser neutros o alcalinos y con frecuencia contienen carbonato de calcio o sulfato de calcio libres. Los suelos seleníferos altamente tóxicos son alcalinos y se encuentran en regiones de bajas precipitaciones pluviales. Suelos seleníferos no tóxicos se encuentran en Hawai y Puerto Rico, son ácidos (pH 4.5 a 6.5), en ellos el selenio está unido a hierro y aluminio y se desarrollan bajo condiciones de humedad. Los suelos pobres en selenio se encuentran en el noroeste del Pacífico, Canadá, nordeste de los Estados Unidos, litoral del Atlántico Sur y una región de la frontera entre Arizona y Nuevo México. En suelos alcalinos, bien aereados, el selenio tiende a formar selenatos bastante disponibles para las plantas y podrían llegar a concentraciones tóxicas.

Los pocos estudios en la República Mexicana revelan que la zona Norte-Centro es selenífera (Sánchez, 1978) y que del Altiplano hacia la costa existe poca concentración de selenio en el suelo (Strouth, 1985; Ordóñez et al., 1990).

Si el contenido de selenio en el suelo es alto, es factible que las plantas tiendan a tener un contenido elevado y por lo tanto ser tóxicas. Pero también existen suelos seleníferos no tóxicos donde el contenido de selenio es alto pero poco disponible para las plantas.

Cuando el selenio pasa del suelo a las plantas en crecimiento, se incorpora en componentes orgánicos, principalmente selenoproteínas con abundante selenometionina.

El contenido normal de selenio en plantas varía entre 0.01 y 1.0 mg/Kg de materia seca. Sin embargo, la concentración es ampliamente variable y algunas plantas alcanzan niveles de hasta 14,999 mg/Kg de materia seca (Marschner, 1986). La mayor parte del selenio en plantas no acumuladoras del mineral está en forma de selenometionina. Reportes en la literatura sugieren que al menos el 50% del selenio en el trigo y más del

70% en la alfalfa está presente como selenometionina. En plantas acumuladoras de selenio, éste se encuentra como un producto de detoxificación análogo a los intermediarios en el metabolismo de los aminoácidos azufrados, tales como selenocistationina y metilselenocisteína (Rosemary, 1990; London, 1991; NRC, 1983; Fassbender y Bornemiza, 1987; Sarkar, 1992; Sunde, 1997).

## 4.2. Compuestos de selenio

El selenio en los suelos está presente como seleniuros, selenio elemental, selenito, selenato y compuestos de selenio orgánico (liberado por la descomposición de plantas seleníferas). Estas formas químicas están estrechamente relacionadas con el potencial de óxido-reducción, pH y solubilidad del elemento (Wild, 1988; Rosemary, 1990).

El selenio elemental en suelos ácidos y neutros es oxidado a selenitos que reaccionan con óxidos de hidrógeno para formar complejos de baja solubilidad no disponible para las plantas y, en caso de encontrarse termodinámicamente estable puede ser formado el complejo hidróxido de selenito férrico. Pero el incremento del pH a 8 ocasiona la descomposición del complejo mencionado, iniciando lentamente la tasa de transformación de selenito a selenato facilitando el consumo de selenio por las plantas (Kabata-Pendias y Pendias, 1992).

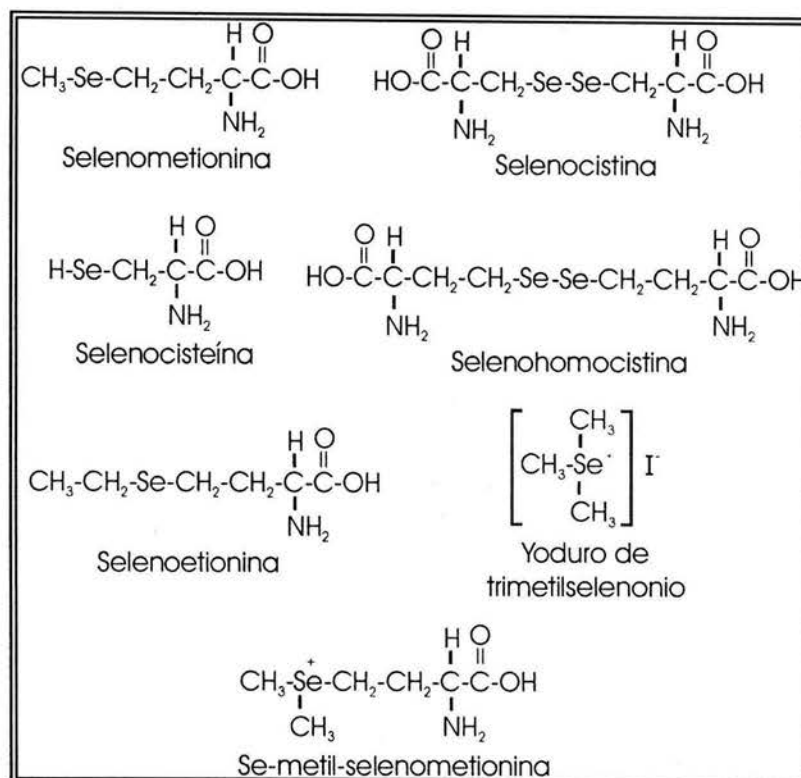


Fig. 3. Compuestos orgánicos de selenio (Brody, 1994; Goessler, 1997).

## 5. Valores de referencia

En la siguiente tabla se presentan algunos rangos “esperados” o de “referencia” para selenio en suero sanguíneo de varias especies animales a partir del nacimiento y hasta la edad adulta. Estos rangos fueron obtenidos de la base de datos del Laboratorio de Diagnóstico de Salud Animal de la Universidad de Michigan, en Estados Unidos, para ayudar a interpretar el estatus de selenio del ganado. Hay un aparente incremento gradual con la edad en las concentraciones de selenio en el suero en todas las especies observadas. Por lo anterior, es muy importante conocer la edad de la especie animal en estudio antes de interpretar los resultados (Stowe and Herdt, 1992)

Tabla 1. Concentraciones esperadas de selenio en el suero sanguíneo según el Laboratorio de Diagnóstico de Salud Animal de la Universidad de Michigan, USA (tomada de Stowe y Herdt, 1992).

EDAD (DÍAS)	ESPECIES			
	BOVINOS	EQUINOS	CERDOS	OVINOS
	ng/mL			
< 1	50 - 70	70 - 90	70 - 90	50 - 80
1 - 9	50 - 70	70 - 90	70 - 120	60 - 90
10 - 29	55 - 75	80 - 100	70 - 120	70 - 100
30 - 70	60 - 80	90 - 110	100 - 160	80 - 110
71 - 180	60 - 80	90 - 110	140 - 190	80 - 110
181 - 300	60 - 80	90 - 110	180 - 220	80 - 110
301 - 700	65 - 90	100 - 130	180 - 220	90 - 120
> 700	70 - 100	130 - 160	180 - 220	120 - 160

Varios investigadores han sugerido que una concentración de selenio de al menos 100 ng/mL de sangre completa está asociada con una óptima respuesta inmune y fertilidad. Pehrson et al. (1999) realizó un estudio donde comparó la concentración de selenio en sangre de becerros suplementados con selenio inorgánico (selenito) y con selenio orgánico de levaduras. Diez de los once becerros tuvieron concentraciones de selenio en sangre menores a 100 ng/mL en el grupo al que se le administró la levadura. Para el grupo con selenito, siete de nueve becerros tuvieron concentraciones de selenio menores a 100 ng/mL y dos becerros de nueve concentraciones menores a 50 ng/mL.

## 6. Intoxicación por selenio (selenosis)

La intoxicación por selenio (selenosis, “vértigo ciego” o “enfermedad del álcali”) tiene importancia considerable en Estados Unidos, Canadá e Irlanda.

Las plantas acumuladoras<sup>10</sup>, además de ser responsables directas de intoxicación, también pueden tomar del suelo el selenio en una forma no utilizable por las plantas no acumuladoras<sup>11</sup> y convertirlo en otra forma que pueda ser absorbida por éstas últimas. Esto puede determinar niveles peligrosos de selenio en los cereales y en otras plantas comestibles. Las concentraciones superiores a 5 ppm se consideran potencialmente tóxicas para animales de pastoreo. Las plantas que contienen cantidades elevadas de selenio normalmente son poco apetecibles y las consumen sólo si no disponen de otro forraje (Humphreys, 1988).

La dosis letal mínima de selenio en forma de selenito sódico es de 3.3 ppm para el caballo, 10 ppm para la vaca y 17 ppm para el cerdo. Los compuestos orgánicos de selenio que se encuentran en las plantas seleníferas son unas dos veces más tóxicos que los seleniuros y selenitos y las dosis críticas son de 3–5 ppm en bovinos. El selenio interacciona con el arsénico, en el sentido que este último aminora la toxicidad o acentúa la deficiencia del selenio. También se ha relacionado con cobre, zinc, plata y mercurio (NRC, 1980; Humphreys, 1988; Shimada, 1983).

---

<sup>10</sup> Las plantas acumuladoras pueden ser de dos tipos: acumuladoras obligatorias (plantas indicadoras) y acumuladoras facultativas (absorbentes secundarias). Las primeras necesitan selenio para su desarrollo y crecen sólo en áreas en las que existe selenio en el suelo. Pueden contener 1000–15000 ppm de selenio. Ejemplos de éstas son: *Astragalus*, *Oonopsis spp.*, *Xylorrhiza spp.* Las segundas, pueden crecer en ausencia de selenio, pero, si existe en el suelo, pueden acumularlo en grandes cantidades (Humphreys, 1988).

<sup>11</sup> Las plantas no acumuladoras si crecen en terrenos ricos en selenio, algunas de ellas pueden contener cantidades perjudiciales de selenio mientras que otras no pueden tolerarlo y detienen su crecimiento o mueren (Humphreys, 1988).



Los animales son hábiles para excretar niveles tóxicos de selenio cuando éste se encuentra en exceso en los alimentos. Niveles muy altos de este elemento tienen probados efectos tóxicos para los animales. Por ejemplo, selenito de sodio dado a cerdas en dosis de 50 veces superior a los niveles usuales de suplementación (10 mg de selenio/kg dietario) resultaron en crecimiento pobre y al mismo tiempo mayor mortalidad de lechones y los sobrevivientes pequeños y débiles.

Los mecanismos bioquímicos de una selenosis siguen siendo oscuros. Es probable que el selenio ejerza su efecto tóxico mediante inhibición enzimática de los sistemas de oxido-reducción del organismo. Cuando el selenio se administra en forma de selenato, entra al organismo y se reduce a selenito; así es llevado por la corriente sanguínea al hígado y al bazo en donde es reducido a selenio elemental, por la glucosa. El selenio elemental no es tóxico. Cuando el organismo no puede reducir el selenito por deficiencia de glucosa o exceso de él, se produce el ataque a las células destruyéndolas. El selenito inhibe aparentemente algunos sistemas enzimáticos.

## **6.1. Formas de intoxicación por selenio**

Se admiten tres formas de intoxicación por selenio: aguda, subaguda o "vértigo ciego" y crónica o "enfermedad del álcali".

### **Intoxicación aguda por selenio**

La intoxicación aguda por selenio se produce principalmente en bóvidos y óvidos por ingestión de suficiente cantidad de plantas seleníferas, generalmente de una vez, como para que se produzcan síntomas tóxicos muy graves. La muerte puede ocurrir desde pocas horas a algunos días después.

Los síntomas incluyen ataxia, fiebre, pulso rápido y débil, meteorismo, cólico, poliuria, dificultad respiratoria, espuma sanguinolenta en nariz y boca, diarrea oscura, postración, letargo y falla respiratoria.

Los hallazgos post-mortem característicos son: hemorragias generalizadas, ascitis<sup>12</sup> y atonía de la musculatura lisa (Humphreys, 1988; Shimada 1983).

### Intoxicación subaguda por selenio

La intoxicación subaguda (vértigo ciego) se produce por ingestión de plantas seleníferas y puede desarrollarse después de un período relativamente corto.

El animal afectado pierde peso, tiene un pelaje pobre y áspero, se aparta del rebaño y manifiesta marcha vacilante y trastornos de la visión. Más tarde, el animal se mueve en círculos y manifiesta una ceguera creciente, sin evitar los obstáculos. Hay también lagrimeo, dolor abdominal intenso, incapacidad para deglutir y, por último, parálisis completa, colapso y muerte por insuficiencia respiratoria. Se afectan igualmente los bóvidos y óvidos. Los animales pueden no aparecer enfermos durante semanas o incluso meses, ocurriendo la muerte a los pocos días de la aparición de los síntomas.

Las lesiones se caracterizan por degeneraciones crónicas en todos los órganos, principalmente el bazo y el hígado. El hígado está atrofiado, necrótico y cirrótico y el bazo hipertrofiado y con zonas hemorrágicas localizadas. La ascitis es casi constante y se han descrito también congestión, hemorragia, edema y reblandecimiento cerebrales (Humphreys, 1998).

---

<sup>12</sup> Exceso de líquido en la cavidad peritoneal causado generalmente por una enfermedad hepática.

### **Intoxicación crónica por selenio**

La intoxicación crónica (enfermedad del álcali) se produce por la ingestión diaria de cereales, hierbas y otras plantas forrajeras que contienen pequeñas cantidades de selenio. Se supone que el selenio de los piensos que producen la enfermedad del álcali se halla ligado a las proteínas de las plantas y que es relativamente insoluble en agua, al contrario que en las plantas indicadoras en las que es fácilmente soluble.

La enfermedad del álcali se caracteriza por el pelo áspero, embotamiento, falta de vitalidad, crecimiento anormal y posterior pérdida de pezuñas y cuernos, caída del pelo, atrofia y cirrosis hepática, nefritis. Aparecen anillos en las pezuñas, inmediatamente debajo de la banda coronaria; en casos graves puede aparecer una grieta, suficientemente profunda para separar el crecimiento antiguo del nuevo.

Las lesiones son parecidas a las del vértigo ciego, siendo los hallazgos más importantes la atrofia del corazón y la atrofia y cirrosis del hígado. También pueden encontrarse lesiones de gastroenteritis y nefritis (Humphreys, 1988).

## **7. Deficiencia de selenio**

Conocido originalmente como factor 3, se le asoció con problemas de intoxicación más que con deficiencias; sin embargo, en los últimos años se ha demostrado su esencialidad e incluso la necesidad de su complementación en las sales mineralizadas para los animales.

La deficiencia de selenio provoca una disminución en la actividad sanguínea de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GSH-Px), la cual está relacionada con el normal

funcionamiento del sistema inmunológico, y del tracto reproductivo tanto en machos como en hembras.

La deficiencia de selenio se presenta en bovinos cuando el contenido del mineral en la ración es inferior a 0.1 ppm.

La deficiencia de selenio se ha reportado en forrajes de Veracruz (Barradas, 1980), Hidalgo (Spross, 1982; Strouth, 1985), Texcoco e Hidalgo (Escobosa *et al.*, 1978), Toluca (Díaz *et al.*, 1994) y Tlaxcala (Ramírez, 1995). Estos problemas están asociados a deficiencias de Se en el suelo (Ramírez, 1995; Díaz *et al.*, 1994). La deficiencia afecta a caprinos en Tlaxcala (Ramírez, 1995), ovinos (Díaz *et al.*, 1994) y bovinos (Rosiles *et al.*, 1993; De Aluja, 1981).

Se ha documentado muy bien que la deficiencia el selenio conlleva a una gran variedad de problemas médicos (Tabla 2).

Tabla 2. Enfermedades relacionadas a la deficiencia de selenio.

ENFERMEDADES	ESPECIE
Necrosis hepática	Rata, conejo, cerdo, pollo
Distrofia muscular	Cerdos, vacas, ovejas
Microangiopatía	Cerdos
Diátesis exudativa	Pollos, pavos
Fibrosis pancreática	Pollos
Retención placentaria	Vacas
Enfermedad de Keshan	Hombre
Cáncer y enfermedad cardiovascular	Hombre
Enfermedades relacionadas con el sistema inmune	Todas las especies

Se conocen o sospechan, varias enfermedades en los bovinos asociadas con la deficiencia de selenio. Estas condiciones incluyen distrofia muscular nutricional, retención de placenta y mastitis. Varios autores han reportado la asociación de otras condiciones con la deficiencia de selenio, incluyendo infertilidad, aborto, nacimiento de terneros prematuros, débiles o muertos; ovarios císticos, metritis, concepción retardada, periodos de celo erráticos, débiles o silenciosos (Waldner et al., 1998).

Generalmente, los signos de deficiencias de selenio son más notables en las hembras y sus crías. Debido a las demandas crecientes para el crecimiento y la dependencia de una única fuente de alimento (leche), la cría probablemente sea la más susceptible a la deficiencia de selenio. Así, la cría depende del contenido de selenio en la leche de la madre del mismo modo que durante el desarrollo fetal. El contenido de selenio en la leche está influenciado por la ingestión de alimentos que contienen este mineral traza (Serra et al., 1996).

Los signos de la deficiencia de selenio pueden ser de dos tipos: aquellos asociados con la vitamina E y aquellos de tipo puro. La mayoría de los casos observados en la práctica son del primer tipo.

Los síntomas de deficiencia pura (esto es, no asociada a vitamina E) son crecimiento pobre, fallas reproductivas, alopecia (en ratas) y degeneración pancreática (en pollos) (Shimada, 1983).

## 8. Métodos de suplementación

### 8.1. Antecedentes

La administración de medicamentos a los animales puede realizarse mediante la dosificación individual de un animal o basándose en una masa a través del alimento o el agua de beber del animal.

La forma de dosificación consiste de un vehículo que contiene al activo, hecho al gusto del cliente, para un compuesto con características físicas y químicas específicas. Los animales son medicados con una variedad de formas de dosificación (aerosoles, bolos y tabletas, cápsulas, cremas, gránulos, implantes, ungüentos, pastas y geles, polvos, soluciones, supositorios, suspensiones), y por varias rutas o vías de administración (oral (por boca, por tubo estomacal, intra-ruminalmente), parenteral (intravenosa, subcutánea, intramuscular, intra-articular, intraperitoneal), tópica (efecto dérmico local, efecto sistémico), oftálmica, rectal, vaginal, intramamaria e inhalación).(Blodinger, 1983).

En ocasiones, la administración de medicamentos a animales requiere de una forma especial que se ajuste a dispositivos mecánicos de dosificación. La liberación del activo en un sitio específico puede obligar al uso de recubrimiento y/o vehículos especiales para promover la pronta acción o para prevenir la destrucción metabólica (Blodinger, 1983).

La suplementación del elemento se puede realizar a través de compuestos orgánicos como selenometionina y selenocisteína pero son costosas e inadecuadas. Las fuentes de suplementación inorgánica resultan la mejor alternativa y se realiza por administración parenteral (subcutánea), oral directa (sales, pellets, cápsulas) y oral indirecta (fertilización de forrajes con selenio) [Ellison, 1992].

Las diferentes formas de suplementación mencionadas presentan ventajas e inconvenientes. En el caso de la administración parenteral resulta el mejor método para restaurar las concentraciones del elemento traza cuando es necesario corregir deficiencias

severas o agudas, por ejemplo, durante la preñez en donde la demanda de microelementos es mayor (Clark, 1992).

Otra ventaja de la ruta parenteral es que se conoce la cantidad precisa del elemento introducido al animal. (Allen y Mallison, 1984)

Con respecto a sales minerales una de sus ventajas es su bajo costo y fácil administración en el alimento. Pero su inestabilidad para mantener el estatus del elemento en el animal por su compleja absorción es mayor en comparación con la vía parenteral y se corren importantes riesgos por la diferente apetencia de los animales y por defectos en la homogenización de las mezclas (Tasker, 1992).

## **8.2. Selenio orgánico**

El selenio orgánico de levaduras es una mejor fuente de suplementación de selenio para todas las especies animales debido a su elevada biodisponibilidad y es retenido más efectivamente en el músculo, leche y tejidos fetales, que el selenio inorgánico (McDowell, 1997).

Numerosas investigaciones han mostrado clara y efectivamente un incremento en la retención del selenio cuando es administrado como selenio de levaduras.

En cerdos (Mahan, 1999; 2000) y bovinos (Ortman y Pehrson, 1999), el selenio orgánico incrementa el contenido de selenio en la leche más que el selenio inorgánico. El selenio orgánico incrementa la concentración de selenio 2 ó 3 veces más en sangre, leche e hígado que el selenio inorgánico (Knowles et al., 1999). El selenio de levaduras incrementó en un 130% el contenido de selenio en la leche en comparación con el control, mientras que el incremento debido al selenito y al selenato fue solo del 20% (Ortman y Pehrson, 1999) (Cuadro 2)

Cuadro 2. Respuestas a Sel-Plex en la fisiología y producción de los animales para consumo (tomado de Lyons, 2002).

<p><b><u>Ganado de carne</u></b> <b>Vaca/Ternero</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor hormona T3, GSH-Px, Selenio</li> <li>• Mayor selenoproteína P</li> <li>• Mayor Selenio en leche y calostro</li> <li>• Mayor IgM en el suero</li> <li>• Mayor retención vs Selenio inyectable</li> </ul> <p><b>Crecimiento/Terminación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conversión más eficiente de alimentos</li> <li>• Reducción de la oxidación de los lípidos de la carne</li> </ul>	<p><b><u>Ganado lechero</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor GSH-Px</li> <li>• Mayor nivel de Selenio en sangre</li> <li>• Mayor nivel de Selenio en leche y calostro</li> <li>• Menor conteo de células somáticas</li> <li>• Reduce la incidencia de mastitis</li> <li>• Mejora la fertilidad</li> <li>• Reduce la incidencia de la retención de placenta</li> </ul>	<p><b><u>Aves</u></b> <b>Ponedoras/Reproductores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor nivel de Selenio en huevos</li> <li>• Mayor nivel de vitamina E en huevos</li> <li>• Incubabilidad aumentada</li> <li>• Menor mortalidad temprana de pollitos</li> <li>• Calidad de huevos de mesa mejorada</li> <li>• Fertilidad de machos mejorada</li> </ul>
<p><b><u>Caballos</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejor retención de Selenio en caballos en ejercicio</li> <li>• Mayor nivel de Selnio en leche y calostro</li> <li>• Mayor IgG en el suero de potros</li> <li>• Reducción del tiempo de expulsión de la placenta</li> </ul>	<p><b><u>Cerdos</u></b> <b>Cerdas/Camada</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejor estatus de Selenio al nacimiento</li> <li>• Mayor nivel de Selenio en leche y calostro</li> <li>• Lechones más uniformes y pesados</li> <li>• Un lechón más por cerda al año</li> </ul> <p><b>Crecimiento/Terminación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor nivel de Selenio en carne</li> <li>• Menor pérdida de agua por goteo</li> <li>• Mejor coloración de la carne</li> </ul>	<p><b><u>Pollos barrilleros</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Emplume más rápido</li> <li>• Mayor hormona T3</li> <li>• Mayor resistencia al estrés</li> <li>• Reducción de la pérdida de agua por goteo</li> </ul> <p><b><u>Peces</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayores títulos de anticuerpos</li> <li>• Incrementa la capacidad de acarreamiento de oxígeno</li> <li>• Mayor nivel de Selenio, GSH-Px</li> <li>• Crecimiento más rápido en bagres</li> <li>• Mejor coloración de la carne de salmónidos</li> </ul>



### 8.3. Parenteral

En rumiantes se manejan dosis de 0.1 a 1 mg de Se/Kg peso vivo. La suplementación en bovinos se realiza con 25 o 30 mg de selenio como selenito de sodio (Tasker, 1992; Spears et al., 1986).

Existen algunos reportes de que dosis superior a 0.35 mg de Se/Kg peso vivo, como selenito o selenato de sodio, resultan letales. Actualmente muchos preparados comerciales de selenio son recomendados para ser usados a dosis de 0.05 mg Se/Kg peso vivo y esta algunas veces resulta baja en el tratamiento parenteral y se requiere repetir nuevamente la dosis a intervalos de semanas (Ullrey, 1992). Si se recomienda de forma rutinaria, se pueden presentar problemas de intoxicación crónica.

Se han empleado exitosamente soluciones acuosas de selenio administradas por vía subcutánea o intramuscular (NRC, 1983). Las inyecciones subcutáneas directas, usualmente como selenito de sodio, son un medio común para la prevención de enfermedades por la deficiencia del mineral en ganado en pastoreo (Underwood and Suttle, 1999). Las inyecciones de selenato de bario han mostrado tener un efecto duradero en rumiantes. El selenato de bario en inyección subcutánea mantiene la concentración de selenio en sangre por al menos 200 semanas en ovejas y sus corderos (Judson et al., 1991).

### 8.4. Bolos

En medicina humana las formas de dosificación sólidas (tales como tabletas o comprimidos) son el medio más comúnmente usado para la administración de un fármaco. La tableta ofrece muchas ventajas sobre otras formas farmacéuticas, entre tales ventajas tenemos el bajo costo de manufactura por unidad, la estabilidad y la facilidad de empaque.

En el caso de los animales, el uso de las tabletas es inconveniente debido a que se les da una dosis en base al peso lo que resulta en una cantidad grande de fármaco. Por ejemplo, las sulfonamidas son prescritas en dosis de 15 por cada 150 libras de peso por lo que una vaca de 600 libras puede recibir 60 g de fármaco el cual, aunado a los excipientes da un objeto inmanejable. Para vencer tal problema se diseñó una tableta cilíndrica o con forma de cápsula comúnmente denominada "bolo". Los bolos son una forma de dosificación útil para el bovino, oveja y cabra, ampliamente utilizada en los Estados Unidos y otros países del mundo. El instrumento para sostener el bolo o dejarlo caer en la boca del animal es conocido como pistola de bolos (Blodinger, 1983).

Algunos bolos intrarruminales están compuestos por selenio elemental (5% en peso) en una matriz de hierro y cuando se administran por vía oral se retienen en retículo-rumen (Kuchel and Buckley, 1969). Los primeros prototipos fueron altamente demandados por ser más efectivos en el mantenimiento y elevación de selenio en sangre hasta por cuatro años (Judson et al., 1991). Pero los bolos comerciales de Nueva Zelanda, Inglaterra y Australia no fueron tan efectivos como el prototipo original y la protección raramente se extendía hasta 12 meses y en algunos casos la liberación de selenio fue solo por 18 semanas.

El peso de los bolos comerciales es de 10 g y su contenido es de 245 a 300 mg de selenio. Los bolos para bovinos presentan un peso de 30 g; contienen de 360 a 500 mg de selenio como selenito de sodio liberando 3 mg de selenio por día y su expulsión es por bomba osmótica. Actualmente la mayoría de las presentaciones comerciales presentan combinaciones con otros microelementos, por ejemplo, cobre y cobalto. (Tasker, 1992; Masters, 1990)

### 8.4.1. Bolos de acción prolongada

Uno de los factores limitantes de la duración de la acción de un fármaco administrado oralmente en humanos es el tiempo de tránsito por el tracto gastrointestinal. Varias técnicas han sido empleadas para desarrollar formas de dosificación oral de acción prolongada, pero una forma de dosis efectiva por más de 12 horas es extremadamente rara. La liberación prolongada se puede lograr controlando la densidad de la formulación o el tamaño del dispositivo. Por ejemplo, en un rumiante como una vaca u oveja, es posible para objetos sólidos el permanecer en el saco ruminoreticular indefinidamente. La densidad del objeto es el factor crítico determinante de la retención del sólido en el saco. Se considera que es deseable un rango de densidades de 1.5 a 8.0. (Blodinger, 1983)

Varios bolos de acción prolongada, comercialmente exitosos, han demostrado las ventajas prácticas de éstos como un producto.

Se han usado bolos de vidrio de liberación lenta que contienen selenio, además de cobre y cobalto, para la prevención de la deficiencia de selenio (Kendall et al., 2001)

### 8.5. Sales

El uso de mezclas de sales fortificadas parece ser el procedimiento más prometedor para la prevención de la deficiencia de selenio (McDowell, 1997). Las mezclas minerales a libre demanda para ganado en pastoreo deben ser formuladas de tal manera que proporcionen de 0.1 a 0.3 mg de selenio/Kg de materia seca.

El selenito y el selenato de sodio son igualmente efectivos, pero el selenato es preferido por ser de toxicidad más baja y menos irritante. Las soluciones de selenato de sodio (1 mg de selenio/mL) son más disponibles para uso inmediato (Podoll et al., 1992).

## 8.6. Aplicación de selenio en fertilizantes

El selenio proporcionado como fertilizante es recibido de manera uniforme por el ganado en pastoreo a través del consumo del forraje. Este método o práctica ha sido probado efectivamente en la prevención de la deficiencia de selenio. Es una práctica usual en Nueva Zelanda (Watkinson, 1983) y en las áreas de elevada precipitación pluvial de Australia (Whelan, 1994) y es prácticamente el único medio de suplementación de selenio en Finlandia (Gissel-Nielsen, 1993).

Se emplean tanto el selenito como el selenato de sodio pero éste último es el más utilizado, debido a su facilidad de consumo por parte de la planta. El proceso de incorporación de selenato de sodio (42% de selenio) en gránulos proporciona máxima seguridad en su operación y distribución en el suelo facilitando su mezcla con fertilizantes. La mínima cantidad que previene la deficiencia es de 8.5 g/ha de selenio y su máxima cantidad es de 10 g /ha de selenio con aplicación anual (Watkinson, 1992).

El proporcionar selenio a través de la fertilización de la pastura tiene muchas ventajas. Permite disminuir los costos de manejo de los animales con tratamientos individuales y es más fácil tratar animales grandes tales como los bovinos. El manejo de la pastura, sin embargo, puede afectar la disponibilidad del selenio para los animales que la consumen (McDowell, 2002).

## 9. Dispositivos de retención en rumen (RRD's)

Un dispositivo de retención en rumen (RDD del inglés "*Rumen Retention Devices*"), asegura una liberación controlada de un fármaco dado y éste puede mantenerse en el reticulorumen por días, semanas, meses o años dependiendo del tiempo de liberación requerido para el fármaco.

Una gran variedad de agentes han sido usados en RRD's con propósitos profilácticos o terapéuticos, entre ellos están: antihelmínticos, nutrientes, promotores del crecimiento y antibióticos (Pope, 1985; Gyurik, 1983).

Los RDD's se agrupan en dos categorías básicas, aquellos que liberan activo de manera constante a lo largo de todo su tiempo de vida en el rumen, dispositivos de liberación sostenida, y aquellos que liberan dosis discretas de una manera pulsátil (por medio de pulsos), dispositivos de liberación intermitente (Gyurik, 1983).

### **9.1. Principios que gobiernan su diseño y funcionamiento**

Las características anatómicas y fisiológicas únicas de los animales rumiantes necesitan características de diseño especiales para los RDD's. Los dos mayores problemas que deben vencer o superar los RDD's son la regurgitación y las condiciones extremas en el ambiente del rumen tales como el pH y la actividad enzimática microbiana (Gyurik, 1983).

#### **Regurgitación**

Una función fisiológica de suma importancia en los animales rumiantes cuando son diseñados los dispositivos de retención ruminal es la *ruminación o rumia*. La rumia es un proceso donde el contenido del rumen que ha sido colectado, masticado, tragado y fermentado durante el pastoreo, es regurgitado y remasticado paulatinamente por el animal. En el ganado vacuno un litro o más puede ser regurgitado o regresado por el esófago en cada tiempo. Existen dos caminos básicos para evitar la regurgitación de un dispositivo intraruminal:

- Elaborándolo lo suficientemente pesado (altamente denso) para que permanezca en el retículorumen
- Por utilización de un diseño geométrico el cual evita el pasaje de regreso a través del esófago (Gyurik, 1983).

**Densidad.** Si un dispositivo es lo suficientemente denso, este permanecerá en la parte anterior del retículorumen en el área llamada retículo. Esta área colecta objetos pesados que pueden ser tragados inadvertidamente, tales como clavos, piedras y objetos semejantes. Las paredes musculosas de este órgano son lo suficientemente duras para ofrecer resistencia a los pinchazos y perforaciones por objetos filosos. Tales objetos, pueden causar reticulitis o "enfermedad de la ferretería". Los casos severos pueden resultar en muerte por penetración de la pared y el pericardio adyacente. Por tanto, es importante evitar partes agudas en los RDD's (Gyurik, 1983).

La densidad mínima para prevenir la regurgitación varía dependiendo de la dieta. Los animales que pastorean necesitan de una densidad mayor porque la motilidad del rumen es mucho más grande en estos animales que en aquellos que reciben una dieta más refinada. Se ha reconocido generalmente que una densidad de 2.25 a 3.5 g/mL puede ser mantenida para prevenir la regurgitación en los animales que pastan. Una densidad de 1.8 g/mL es probablemente suficiente para animales estabulados (Gyurik, 1983).

**Geometría.** Varias geometrías han sido utilizadas para prevenir la regurgitación o el paso de dispositivos una vez que están en el retículorumen. Los dispositivos han sido diseñados para desplegarse en el rumen (geometría variable), dando lugar a una gama abundante de formas, incluyendo aspas (bastidores) y hojas plegables. Para facilitar la dosificación, la eventual geometría se contiene mediante un seguro digerible o soluble, tales como bandas (correas, cintas, abrazaderas) de celulosa o gelatina, las cuales se desintegran enteramente después de ingresar en el retículorumen.

Para la retención, estos son dos puntos a considerar: a) todo lo que un rumiante puede tragar, potencialmente lo puede expeler, y b) se conoce que las ovejas regurgitan más fácilmente los dispositivos que el ganado vacuno. La regurgitación puede mantenerse en un mínimo por atención cuidadosa del diseño correcto (Gyurik, 1983).

### **Ambiente del rumen**

Para una buena comprensión del extremo ambiente dentro del rumen, es necesario antes de que uno pueda diseñar dispositivos de retención en rumen (RDD's) durables y que además funcionen con resultados reproducibles, conocer los siguientes factores:

**pH del rumen.** El pH del rumen puede variar entre 5 y 7 unidades en animales sanos. Esto depende principalmente del tipo de dieta, de la especie o linaje del animal. Esta es una consideración muy importante ya que algunos dispositivos son sensibles a los cambios de pH los cuales no son consistentes en su funcionamiento (Gyurik, 1983).

**Atmósfera del rumen.** La atmósfera del rumen es anaeróbica, las condiciones son altamente reductoras. Los gases principales son: hidrógeno, metano y dióxido de carbono. Los dispositivos deben de estar diseñados para soportar estas condiciones; también es necesario resaltar que los estudios in vitro no pueden ser relevantes para los resultados in vivo, si el dispositivo es sensible a estas condiciones (Gyurik, 1983).

**Microflora del rumen.** La microflora simbiótica del rumen ha coevolucionado para efectuar la predigestión de polisacáridos de difícil degradación, principalmente celulosas, que forman la mayor parte de la dieta del rumiante. Los más reciben en cambio un nicho confortable. Las enzimas liberadas por tales organismos son capaces de romper casi todo dentro del rumen, de manera que materiales inertes capaces de soportar estas sustancias

deben utilizarse en los dispositivos. Aun cuando diversos plásticos (polietileno, propileno) y el acero inoxidable no durarían mucho en el rumen ambos son buenas elecciones para los dispositivos desarrollados para mantener en el rumen. Otra vez los modelos in vitro deben usarse con precaución; es posible mantener rumenes artificiales para técnicas de fermentación continua en el laboratorio pero solo con una gran experiencia y alta inversión. Es más fácil realizar el estudio del funcionamiento de los dispositivos en los animales blanco directamente. Especialmente a través del uso de animales de estudio con rumen fistulado los cuales tienen una cánula removible a través de la cual el dispositivo puede ser colocado y removido (Gyurik, 1983).

### **Resistencia al activo**

Muchos han escrito acerca de las consecuencias de una terapia antihelmíntica a largo plazo y cómo impacta el fenómeno de la resistencia de los parásitos al fármaco (principio activo). El abuso en el uso de los agentes quimioterapéuticos ha llevado al desarrollo de la resistencia en poblaciones de "helmintos", especialmente en áreas de crianza de pastoreo del hemisferio sur. La liberación de niveles subterapéuticos del fármaco por periodos prolongados de tiempo puede incrementar substancialmente el riesgo de "presión por selección", especialmente en la etapa final, o disminución en los niveles de liberación del activo con respecto al tiempo, como es común en la mayoría de los dispositivos de lenta liberación. Este problema también puede presentarse en la dosificación mediante sistemas de liberación intermitente, especialmente cuando el mismo activo es empleado en cada liberación, esto por transporte pasivo. La elección de intervalos apropiados y la minimización del número de liberaciones deben por lo tanto considerarse juiciosamente (Gyurik, 1983).



## 9.2. Razones para el éxito de los RDD's

En adición a la conveniencia en cuanto a trabajo y economía, las siguientes son razones importantes en la generación de un alto interés en este tipo de dispositivos. (Gyurik, 1983).

- Reducción del estrés debido a la manipulación (manejo) de los animales. Las pérdidas económicas son sostenidas por el continuo manejo de los animales durante el tratamiento. Estas pérdidas son difíciles de cuantificar, pero suelen ser considerables. Reduciendo el número de episodios de manejo dará como resultado un gran beneficio para los ganaderos que se ve reflejado como un incremento en peso de los animales, mayor producción y además de una baja en el índice de mortalidad (Gyurik, 1983).
- Optimización de programas estratégicos. Los RDD's incorporan prácticas de manejo que serían difíciles de desarrollar periódicamente en el campo. Esto es especialmente cierto en programas de tratamiento antihelmíntico, los cuales se han desarrollado a un nivel muy sofisticado en muchas partes del mundo (Gyurik, 1983).

## 9.3. Consideraciones regulatorias

### Residuos de activo

Los rumiantes, debido a que son criados como fuente de alimento, presentan una consideración adicional para el diseño de RDD's. Cuando se administran activos a animales productores de carne, un periodo de espera llamado "tiempo de retiro" es prescrito por las agencias regulatorias, antes del cual, el animal no debe ser sacrificado y la carne no debe disponerse para el consumo humano. Este periodo de espera varía

dependiendo del activo y de la dosis usada. Un RDD no debe ser diseñado en forma tal que los residuos de activo no exedan los niveles permisibles al tiempo en que el animal será dispuesto para alimento. De otra forma, periodos de espera indeseablemente prolongados pueden asignarse al dispositivo, impactando adversamente en su uso en el mercado (Gyurik, 1983).

### **Impacto ambiental**

Los RDD's deben diseñarse considerando los efectos adversos potenciales. Los dispositivos de liberación sostenida desafían química y biológicamente (**crónicamente**) al ecosistema con niveles bajos de activo que pueden afectar adversamente a otros organismos; esto puede ser grave, especialmente si el activo posee un amplio espectro de actividad. Los dispositivos de liberación intermitente pueden mitigar este riesgo, logrando que el número de liberaciones del activo se mantenga en el mínimo necesario para lograr el efecto deseado (Gyurik, 1983).

La liberación de activos para la salud animal por medio de RDD's continúa siendo un área excitante para la innovación adicional en el futuro de nuevas tecnologías, llevando a nuevos avances en la producción ganadera que revolucionará los conceptos tradicionales en los años por venir.

**Hipotesis**

**Hipótesis nula:**

1. El selenio orgánico de levaduras, administrado en un bolo intrarruminal, tiene el mismo efecto que el selenito de sodio sobre la concentración de selenio y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma.
2. No existe correlación entre la concentración de selenio y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma.

**Hipótesis alterna:**

1. El selenio orgánico de levaduras, administrado en un bolo intrarruminal, afecta la concentración de selenio y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma en mayor grado que el selenito de sodio.
2. Existe correlación entre la concentración de selenio y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma.

**Objetivos**

## Objetivo General

Desarrollar un bolo de liberación prolongada a base de selenio orgánico de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) para ser administrado intraruminalmente a ganado lechero como una alternativa para la suplementación de Selenio.

## Objetivos Particulares

1. Desarrollar un bolo de liberación prolongada que permita la administración intraruminal del selenio orgánico a bovinos productores de leche.
2. Determinar el efecto del bolo intraruminal sobre la actividad antioxidante de la glutatión peroxidasa en plasma.
3. Determinar el efecto del bolo intraruminal sobre la concentración de selenio en plasma.
4. Determinar si existe correlación entre el contenido de selenio y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, ambos en plasma.

# **Material y Métodos**

## 12. Materiales y Métodos

### 12.1. Descripción del área de estudio

El presente trabajo se realizó en dos fases y cada una a su vez en una localidad distinta. La primera fase se llevó a cabo en la Granja Experimental de la Universidad Autónoma de Chapingo, ubicada en el municipio de Texcoco, estado de México. Dicho municipio se localiza entre los 18° 21' y 20° 17' de latitud Norte y los 98° 35' y 100° 36' de longitud Oeste. La altitud máxima es de 5482 m sobre el nivel del mar. La temperatura media oscila entre los 10 y 16°C y el clima predominante es el cálido húmedo con lluvias en verano (Blanco, 1997). La segunda fase fue realizada en el municipio de Tizayuca en el estado de Hidalgo. Dicho municipio se encuentra ubicado en la latitud norte 19°, 50', 30 y longitud oeste 98°, 59', 45. La altitud es de 2270 m sobre el nivel del mar. La temperatura promedio es de 15°C y presenta un clima templado.

### 12.2. Alimentación de los animales empleados

Los bovinos empleados en la Granja Experimental de la Universidad Autónoma de Chapingo fueron alimentados con alfalfa *ad libitum*, concentrado y maíz ensilado.

Con respecto a las vacas del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, S. A. de C. V. (CAITSA), la dieta de los animales se muestra en la Tabla 3.



Tabla 3. Dieta proporcionada a los animales empleados en el estudio exploratorio.

COMPONENTE MES	CANTIDAD (%)			
	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE
Alfalfa seca	25.0	-----	-----	18.0
Alfalfa ensilada	14.0	18.0	18.0	18.0
Alfalfa empacada	-----	17.0	17.0	-----
Concentrado <sup>a</sup>	28.0	24.0	24.0	-----
Concentrado <sup>b</sup>	-----	-----	-----	23.0
Licor de Maíz	6.00	8.00	-----	-----
Ganaleche <sup>®</sup>	-----	18.0	18.0	-----
Magnafoscal <sup>®</sup>	-----	-----	-----	0.20
Biofos <sup>®</sup> Plus	-----	-----	-----	0.20
BioMicro <sup>®</sup>	-----	-----	-----	0.10
Bagazo de cervecería	-----	-----	8.00	32.0
Agua	27.0	15.0	15.0	8.50

<sup>a</sup> 85% alimento balanceado Premium<sup>®</sup> Especial, 3% de soya, 1.5% de grasa de sobrepaso, 1% de bicarbonato de sodio, 0.5% de Magnafoscal<sup>®</sup>, 0.5% de Biofos<sup>®</sup> Plus

<sup>b</sup> Salvado, cema, pastas de oleaginosas, grasa de sobrepaso, vitaminas, sal común

<sup>c</sup> A las vacas próximas al parto se les administraron 10 mL de vitamina D, 10 mL de Muse<sup>®</sup> y 10 mL de Parfosal<sup>®</sup>.

En cuanto al contenido de selenio, el alfalfa y el suplemento mineral (Biofos<sup>®</sup> Plus) en la dieta tuvieron: 0.02 mg Se/Kg materia seca y 0.8 mg Se/Kg materia seca, respectivamente.

## **12.3. Descripción general de las fases de investigación**

### **12.3.1. Fase 1. Estudio exploratorio**

#### **12.3.1.1. Experimento 1. Efecto de la dosis oral de selenio orgánico sobre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-Px en plasma.**

##### **Unidad experimental**

Se trabajó con 20 vacas Holstein con un peso promedio de 500 Kg sin aparentes signos de enfermedad. Los animales se distribuyeron al azar en 2 grupos (testigo y con tratamiento). Se tomaron muestras de sangre a las 7:00 a.m. cada 7 días durante los meses de junio y julio del 2002.

##### **Variables de respuesta**

Fueron la concentración de selenio en plasma y la actividad de la enzima GSH-Px en plasma.

##### **Tratamiento de las muestras**

Se colectaron 120 muestras de sangre. La colección de la sangre se realizó con tubos Vacutainer® de 7 mL con anticoagulante (K<sub>3</sub> EDTA), durante 35 días, a las 7:00 a.m. y almacenadas a 4°C inmediatamente después del muestreo. Los tubos fueron centrifugados a 2500 rpm durante 15 min. El plasma obtenido se mantuvo en refrigeración (-20°C) hasta su análisis.

La determinación de selenio fue con la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica con generador de hidruros (EAAGH) descrita por Gleason (2003) y la actividad enzimática de la GSH-Px de acuerdo a la técnica descrita por Paglia y Valentine (1967) con algunas modificaciones (ver Anexo 1.4).

### **Planteamiento estadístico**

#### **Hipótesis nula:**

El selenio orgánico de levaduras, administrado en un bolo intrarruminal, no afecta la concentración de selenio y la actividad de la enzima GSH-PX en plasma.

#### **Hipótesis alterna:**

El selenio orgánico de levaduras, administrado en un bolo intrarruminal, afecta la concentración de selenio y la actividad de la enzima GSH-Px en plasma.

### **Diseño experimental**

Los tratamientos fueron asignados a las unidades experimentales mediante un diseño completamente al azar. Se hicieron comparaciones ortogonales de las medias para encontrar diferencias entre ellas y para evaluar el efecto del tiempo sobre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-Px, los datos se analizaron mediante un diseño de mediciones repetidas en el tiempo. Las variables independientes fueron la suplementación de selenio (tratamiento), el tiempo de muestreo y el valor inicial de la respuesta. Las variables dependientes fueron la concentración de selenio en plasma, la actividad de la enzima GSH-Px en plasma. Los animales dentro del tratamiento fueron usados como término del error.

### Modelo estadístico

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_k + \beta_{ij} + (\tau\alpha)_{ik} + \xi_{ijk}$$

Donde:

$y_{ijk}$  = j-ésima observación de la variable de respuesta tomada bajo el i-ésimo tratamiento a tiempo k

$i = 1, 2, \dots, \tau$

$j = 1, 2, \dots, n$

$k = 1, 2, \dots, t$

$\mu$  = media general

$\tau_i$  = efecto del i-ésimo tratamiento

$\alpha_k$  = efecto del k-ésimo tiempo

$\beta_{ij}$  = efecto aleatorio asociado al j-ésimo animal en el tratamiento i

$(\tau\alpha)_{ik}$  = efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento por el k-ésimo tiempo

$\xi_{ijk}$  = error aleatorio asociado con el j-ésimo animal en el tratamiento i a tiempo k

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron usando PROC MIXED del paquete estadístico SAS® (1999) como un diseño completamente al azar con mediciones repetidas. Se utilizó PROC CORR del mismo paquete estadístico para examinar la correlación entre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-PX, ambos en plasma. La significancia estadística se declaró a  $P < 0.05$  para todas las comparaciones.

## 12.3.2. Fase 2. Estudio comparativo

### 12.3.2.1. Experimento 1. Efecto de la dosis oral de selenio orgánico en comparación con la dosis oral de selenio inorgánico sobre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-Px en plasma.

#### Unidad experimental

Se trabajó con 30 vacas Holstein de 550 Kg en promedio sin aparentes signos de enfermedad y en el último tercio de la gestación<sup>13</sup>. Los animales se distribuyeron al azar en 3 grupos (testigo, bolo con selenio de levaduras y bolo con selenito de sodio). Se tomaron muestras de sangre a las 7:00 a.m. cada 7 días durante los meses de mayo, junio, julio, agosto y septiembre del 2003 dado que los animales no tenían el mismo tiempo de gestación al inicio del experimento (ver Anexo 6).

#### Variables de respuesta

Fueron la concentración de selenio en plasma y la actividad de la enzima GSH-Px en plasma.

#### Tratamiento de las muestras

Se colectaron 300 muestras de sangre. La colección de la sangre se realizó con tubos Vacutainer® de 7 mL con anticoagulante (K<sub>3</sub> EDTA), durante 56 días previos al parto, a las 7:00 a.m. y almacenadas a 4°C inmediatamente después del muestreo. Los tubos fueron centrifugados a 2500 rpm durante 15 min. El plasma obtenido se mantuvo en refrigeración (-20°C) hasta su análisis. La determinación de selenio fue con la técnica de

---

<sup>13</sup> Los bolos se administraron al inicio del periodo de secado.

Espectroscopia de Absorción Atómica con generador de hidruros (EAAGH) descrita por Gleason (2003) y la actividad enzimática de la GSH-Px de acuerdo a la técnica descrita por Paglia y Valentine (1967) con algunas modificaciones (ver Anexo 1.4).

### **Planteamiento estadístico**

#### **Hipótesis nula:**

El selenio orgánico de levaduras, administrado en un bolo intrarruminal, tiene el mismo efecto con respecto al selenito de sodio sobre el nivel de selenio y la actividad de la enzima GSH-Px en plasma.

#### **Hipótesis alterna:**

El selenio orgánico de levadura, administrado en un bolo intrarruminal, afecta la concentración de selenio y la actividad de la enzima GSH-Px en plasma en mayor grado que el selenito de sodio.

### **Diseño experimental**

Los tratamientos fueron asignados a las unidades experimentales mediante un diseño completamente al azar. Se hicieron comparaciones ortogonales de las medias para encontrar diferencias entre ellas y para evaluar el efecto del tiempo sobre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-Px, los datos se analizaron mediante un diseño de mediciones repetidas en el tiempo. Las variables independientes fueron la suplementación de selenio (tratamiento), el tiempo de muestreo, el valor inicial de la respuesta y el número de partos. Las variables dependientes fueron la concentración de selenio en plasma, la actividad de la enzima GSH-Px en plasma. Los animales dentro del tratamiento fueron usados como término del error.

**Modelo estadístico**

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_k + \beta_l + \chi_{ij} + (\tau\alpha)_{ik} + \xi_{ijk}$$

Donde:

$y_{ijk}$  = j-ésima observación de la variable de respuesta tomada bajo el i-ésimo tratamiento a tiempo k

$i = 1, 2, \dots, \tau$

$j = 1, 2, \dots, n$

$k = 1, 2, \dots, t$

$l = 1, 2, \dots, n$

$\mu$  = media general

$\tau_i$  = efecto del i-ésimo tratamiento

$\alpha_k$  = efecto del k-ésimo tiempo

$\beta_l$  = efecto del l-ésimo parto

$\chi_{ij}$  = efecto aleatorio asociado al j-ésimo animal en el tratamiento i

$(\tau\alpha)_{ik}$  = efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento por el k-ésimo tiempo

$\xi_{ijk}$  = error aleatorio asociado con el j-ésimo animal en el tratamiento i a tiempo k

**Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron usando PROC MIXED del paquete estadístico SAS® (1999) como un diseño completamente al azar con mediciones repetidas. Se utilizó PROC CORR del mismo paquete estadístico para examinar la correlación entre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-PX, ambos en plasma. La significancia estadística se declaró a  $P < 0.05$  para todas las comparaciones.

# **Resultados y Discusion**



## 13. Resultados y discusión

### 13.1 Fase 1. Estudio exploratorio

#### 13.1.1. Método de desarrollo de la forma farmacéutica

Tomando en consideración los criterios de densidad y forma geométrica para lograr el desarrollo de formas farmacéuticas intraruminales de liberación prolongada, se desarrollaron en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán bolos con selenio orgánico de levaduras para determinar la factibilidad de su empleo para la administración intraruminal del selenio orgánico.

Se fabricaron lotes de bolos (el granulado se preparó utilizando el método de granulación por fusión) con el producto comercial Levinact® y trióxido de bismuto como densificador. La formulación se muestra enseguida.

Tabla 4. Formulación de los bolos con Levinact®

COMPONENTE	%
Trióxido de Bismuto ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ )	60.0
Cutina	25.0
Levinact®	14.5
Estearato de magnesio	0.50

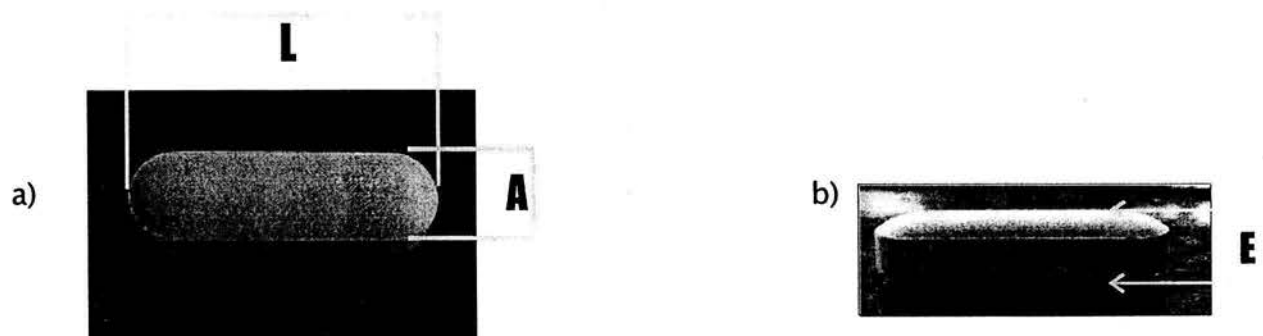


Figura 4 a) y b). Dimensiones de los bolos empleados en los estudios *in vivo*: A: ancho (2 cm), L: largo (6.4 cm) y E: espesor (1.5 cm).

Se fabricaron bolos con trióxido de bismuto y se les realizó la prueba de densidad<sup>14</sup>, encontrándose que se obtenían bolos con una densidad de 2.3 g/mL que según Blodinger (1983) puede considerarse como adecuada.

Una vez comprobado que a partir de la formulación arriba mencionada se podían fabricar bolos consistentes de manera uniforme, se fabricaron los bolos que serían utilizados para las pruebas *in vivo*. Se realizaron los cálculos para que cada bolo proporcionara una dosis diaria de 0.1 mg de selenio/kg de materia seca consumida durante una semana, considerando a un animal de 550 Kg. Así los bolos tuvieron una masa de 33.2 gramos aproximadamente con 4.814 g de levadura enriquecida equivalentes a 9.49 mg de selenio. Cabe mencionar que se incorporó esta cantidad de selenio en el bolo esperando que éste liberara el selenio durante aproximadamente seis días.

### 13.1.2. Integridad de los bolos

Se realizó una prueba de disolución sencilla a algunos de los bolos fabricados con el objeto de verificar su consistencia e integridad. Las condiciones a las que se efectuó la prueba fueron las siguientes:

- Tipo de Disolutor: Automatizado
- Aparato: USP II (Paletas)
- Medio de disolución: agua desionizada (1000 mL)
- Temperatura: 37°C
- Velocidad de agitación: 60 rpm
- Duración de la prueba: 175 horas

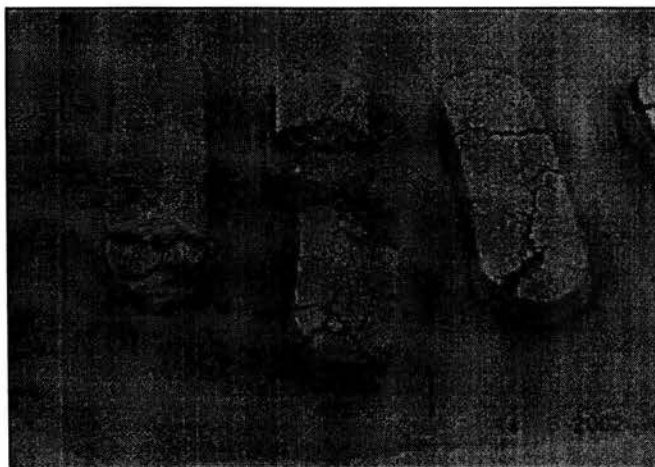
---

<sup>14</sup> La densidad del bolo debe ser mayor a 1.8 g/mL para evitar que el animal lo regurgite.

Los bolos perdieron su integridad física tres días después de iniciada la prueba de disolución. Al término de ésta se recuperaron cuidadosamente los bolos y se secaron para posteriormente tomar fotografías de su superficie empleando para ello un microscopio espectroscópico.

En la Figura 5 a) y b) se observan claramente las condiciones físicas que tenían los bolos al término de la prueba. En la Figura 6 a) y b) se observa la erosión de la superficie de los bolos así como los poros y canalículos que se forman al penetrar el medio de disolución en ellos, mientras que en la Figura 7 a) y b) se observa la erosión del interior de los bolos donde también se han formado poros y canalículos.

a)

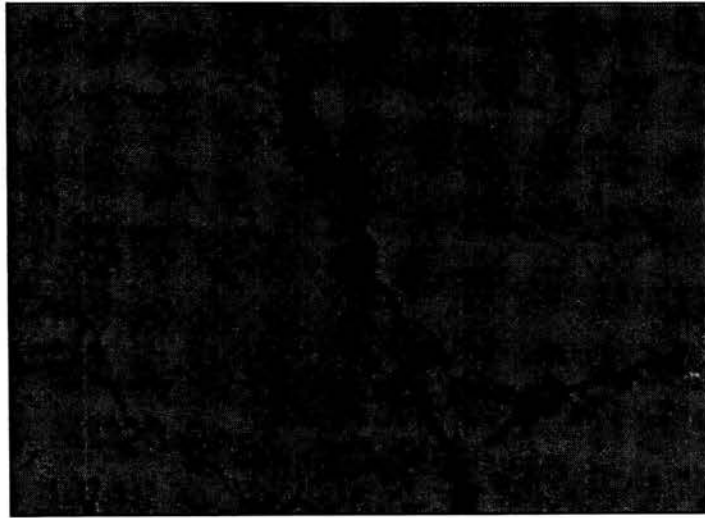


b)



Figura 5 a) y b). Bolos oblongos al término de la prueba de disolución en agua a 37°C.

a)



b)

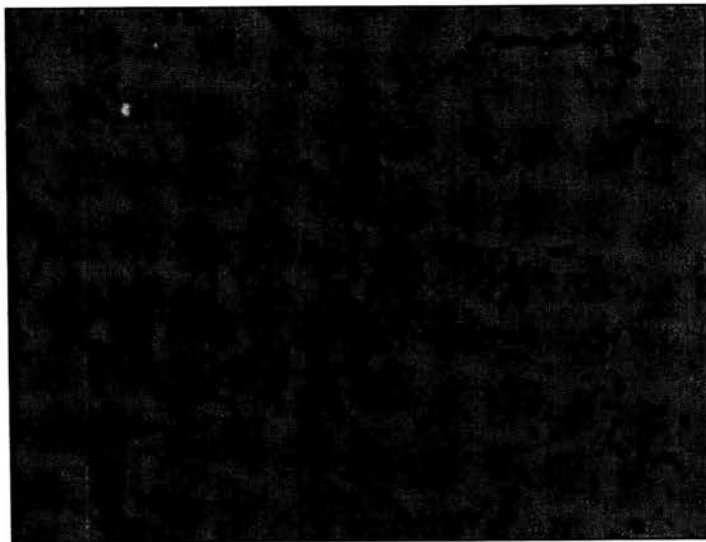
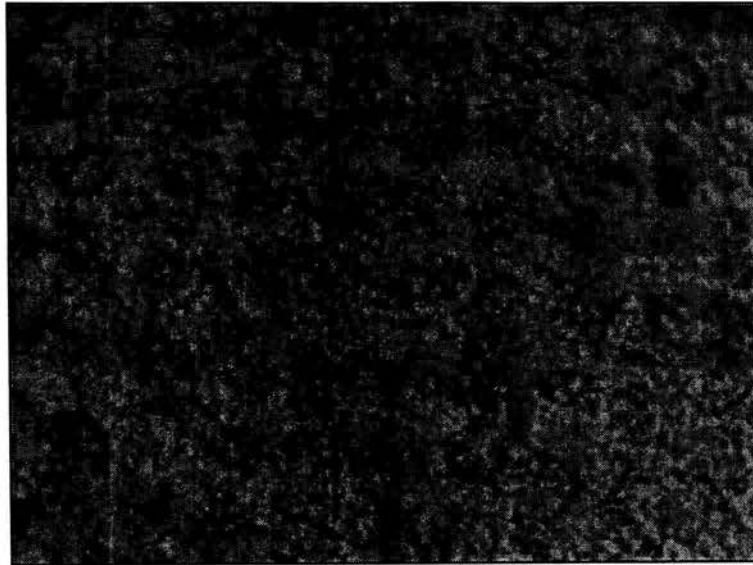


Figura 6 a) y b). Superficie del bolo al término de la prueba de disolución en agua a 37°C.

a)



b)

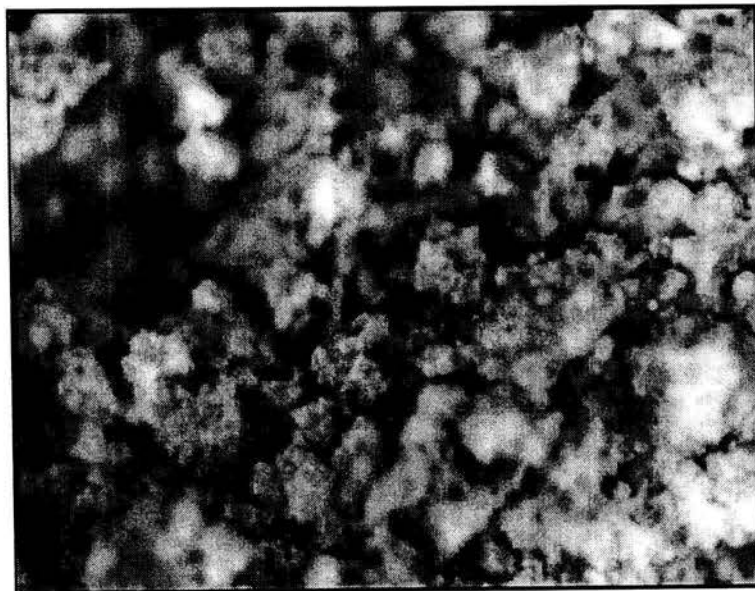


Figura 7 a) y b). Interior del bolo al término de la prueba de disolución en agua a 37°C.

### 13.1.3. Liberación *In Vivo*

#### 13.1.3.1. Perfiles plasmáticos de selenio

Como parte del estudio exploratorio se administraron algunos de los bolos fabricados a vacas lecheras de la raza Holstein, de 500 kilos de peso en promedio, estabuladas, para evaluar su comportamiento *in vivo*. Dicho estudio se llevó a cabo en la Granja Experimental de la Universidad Autónoma de Chapingo.

Los animales se distribuyeron en dos grupos de 10 animales cada uno, el grupo testigo (sin bolo) y el grupo al que se le administró el bolo con levaduras. Al realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se encontró diferencia significativa entre ellos. Las vacas que recibieron el selenio suplementario tuvieron mayores concentraciones de selenio en comparación con las vacas testigo ( $P < 0.05$ ). La covariable, concentración inicial de selenio en plasma, no tuvo efecto significativo ( $P > 0.05$ ). Del mismo modo, no hay efecto del tiempo de muestreo sobre la concentración de selenio en plasma ni tampoco de la interacción del tiempo con el tratamiento ( $P > 0.05$ ; ver Anexo 7). En la Figura 8 se muestran los perfiles plasmáticos promedio para ambos grupos de animales.

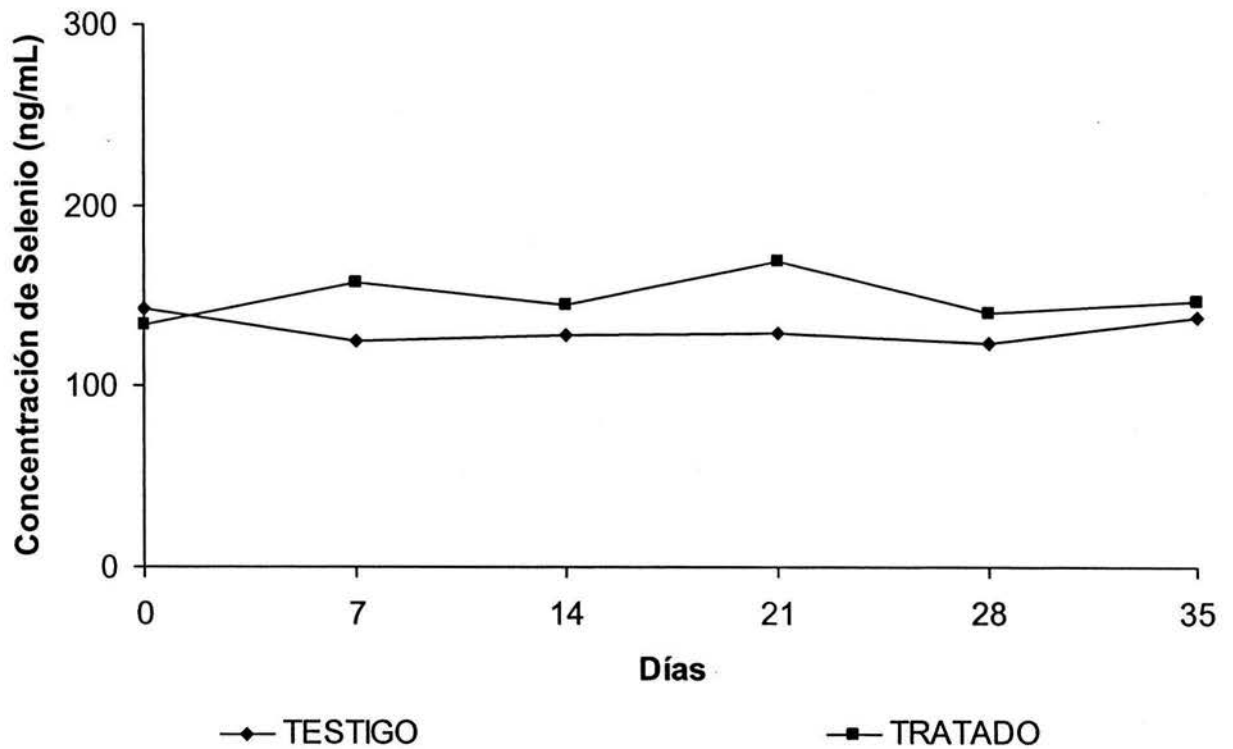


Figura 8. Efecto de la administración de un bolo intrarruminal de liberación prolongada con una dosis de 9.5 mg de selenio como selenio orgánico (Levinact®) sobre la concentración de selenio en plasma de bovinos lecheros.

Tabla 5. Concentración de selenio en plasma (ng/mL) de vacas Holstein tras la administración de un bolo intrarruminal con selenio orgánico de levaduras

Grupo	Días de experimentación						
	0	7	14	21	28	35	
Testigo	142	125	128	129	124	138	131
Tratado <sup>1</sup>	134	157	145	169	140	147	149
$\bar{X}$	138	141	136	149	132	142	

<sup>1</sup> Los animales recibieron un bolo de 33.2 de peso en promedio con 9.5 mg de selenio como selenio orgánico de levaduras (Levinact®).



Como puede verse en la Fig. 8, los animales del grupo testigo mostraron concentraciones de selenio en plasma menores que los animales a los que se les administró el bolo con levaduras (ver Tabla 5). Del mismo modo, se observa que las concentraciones de selenio en el plasma de los animales testigo se mantuvieron más o menos constantes mientras que el grupo tratado mostró mayor fluctuación en dichas concentraciones pero se mantuvieron por arriba de las de los animales testigo (entre 134 y 147 ng/mL), lo cual se atribuye al bolo administrado. Lo anterior indica que, aunque los animales al inicio del estudio poseían concentraciones del mineral en plasma dentro del rango considerado como aceptable por diversos investigadores (Stowe and Herdt, 1992; Ellis et al., 1997), la suplementación de selenio tuvo un efecto positivo sobre dichas concentraciones (las incrementa) y podría mantenerlas en niveles altos por más tiempo dado que al último día de muestreo aún se encontró una concentración superior a la adecuada del mineral. Esto último puede ser útil, especialmente cuando los animales se encuentran en los periodos de gestación o lactancia dado que en dichos periodos aumentan los requerimientos de minerales por parte del animal como resultado de la formación y desarrollo del feto así como por la producción láctea.

#### **13.1.4. Actividad de la enzima GSH-Px en plasma**

El análisis estadístico de los datos obtenidos mostró que no hubo efecto de la dosis de selenio administrada en el bolo sobre la actividad de la enzima ( $P > 0.05$ ) mientras que el tiempo de muestreo así como la actividad inicial de la enzima en plasma si tuvieron efecto sobre ésta ( $P < 0.05$ ) para ambos casos) [ver Anexo 8]. En la Figura 9 y en la Tabla 6 se muestran las medias de cuadrados mínimos ajustadas por la covariable (actividad inicial de la enzima) para ambos grupos de animales.

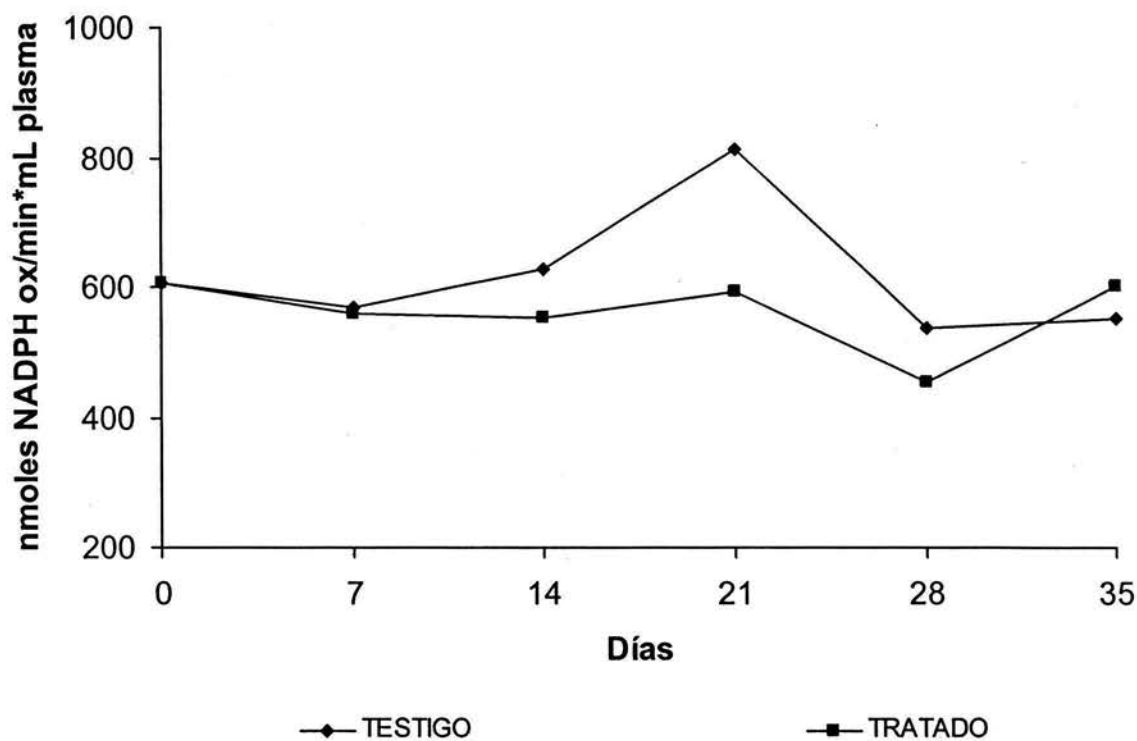


Figura 9. Efecto de la administración del bolo intrarruminal de liberación prolongada con una dosis de 9.5 mg de selenio como selenio orgánico (Levinact®) sobre la actividad de la GSH-Px en plasma de bovinos lecheros.

Como se puede observar en la Tabla 6, la actividad enzimática de ambos grupos de animales muestra la misma fluctuación a través del tiempo y aunque el grupo testigo presenta la mayor actividad enzimática promedio para el grupo al que se suplementó con Levinact® esta fluctuación es menos marcada, lo que se infiere es debido a la dosis de selenio administrada en el bolo.

Tabla 6. Actividad de la enzima GSH-PX (nmoles NADPH ox/min\*mL plasma) de vacas Holstein tras la administración de un bolo intrarruminal con selenio orgánico de levaduras

Grupo	Días de experimentación						
	0	7	14	21	28	35	X
Testigo	655	569	627	813	538	555	620
Tratado <sup>1</sup>	557	559	555	593	453	602	553
$\bar{X}$	606	564	591	703	495	579	

<sup>1</sup> Los animales recibieron un bolo de 33.2 de peso en promedio con 9.5 mg de selenio como selenio orgánico de levaduras (Levinact <sup>®</sup>).

Ahora bien, en cuanto a efectos principales, también se encontró que existe un efecto del tiempo de muestreo a la tercera potencia ( $P < 0.05$ ) sobre actividad de la enzima, de ahí la fluctuación observada. No obstante, para definir el efecto del tiempo sobre la actividad de la enzima para cada uno de los tratamientos, la interacción tiempo\*tratamiento debía ser significativa pero en este caso no fue así ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, el hecho de que exista un efecto principal del tiempo indica que algunos otros factores influyeron para que dicha interacción no fuera importante, por ejemplo: la duración del periodo de muestreo que quizá fue muy corto para poder apreciar mejor el efecto del tiempo; los animales algunas veces eran alimentados antes de que se les tomara la muestra de sangre por lo tanto no siempre se tomaron las muestras bajo las mismas condiciones; los animales estaban en diferentes corrales y el reunirlos en el área de toma de muestra les generaba estrés y éste último modificó las condiciones fisiológicas a las cuales se tomó la muestra, etc.

### 13.1.5. Correlación entre la concentración de selenio en plasma y la actividad de la GSH-Px en plasma

El análisis estadístico reveló que existe una correlación lineal pequeña y no significativa ( $r=0.17$ ;  $P>0.05$ ) entre las variables (ver Anexo 9) lo que concuerda con lo encontrado por Ullrey (1987) quien menciona que las correlaciones de la actividad de la GSH-PX en plasma con la concentración de selenio en plasma no son muy altas.

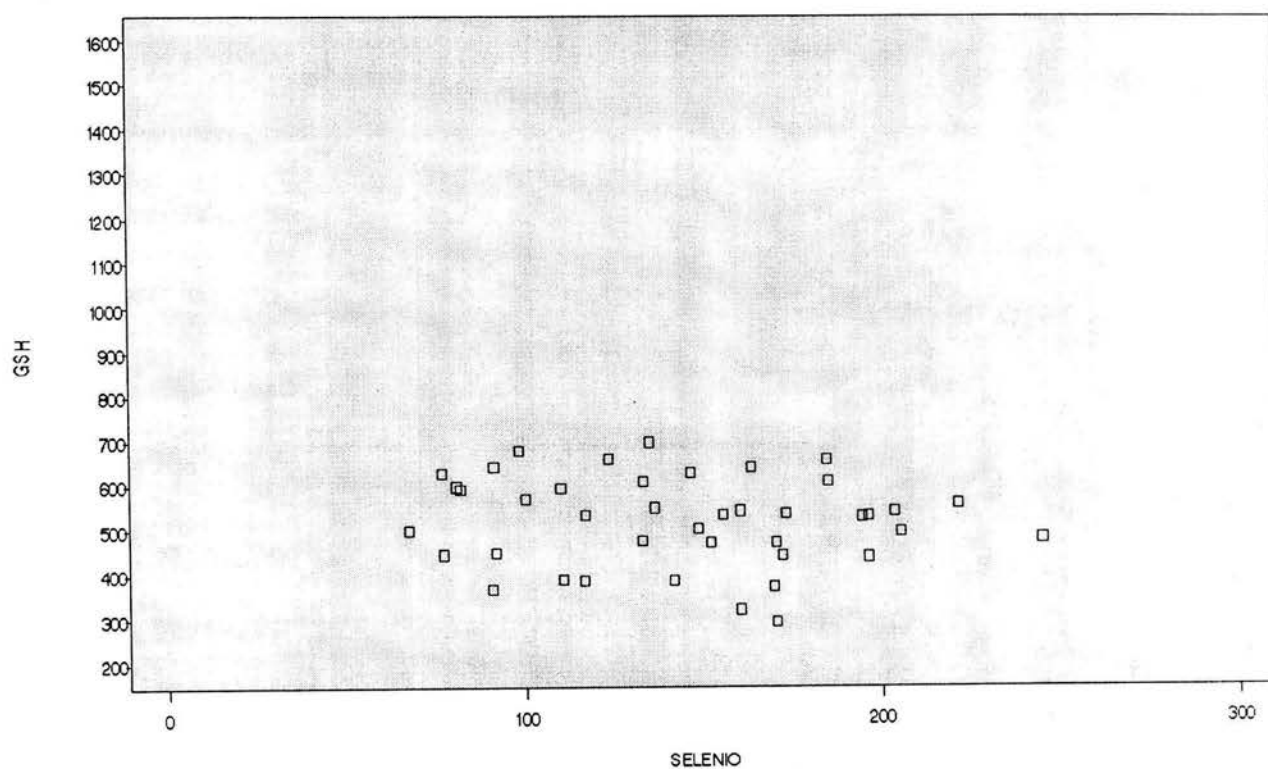


Figura 10. Correlación entre la concentración de selenio (ng/mL) y la actividad de la GSH-Px (nmoles NADPH ox/min\*mL plasma) en plasma de bovinos lecheros después de 35 días de tratamiento.

## 13.2. Fase 2. Estudio comparativo

### 13.2.1. Determinación de selenio total en las levaduras enriquecidas

Con el propósito de verificar el contenido de selenio en las levaduras enriquecidas proporcionadas por los proveedores: BioTecApSa de C.V. y Alltech México se llevó a cabo el análisis de dichas materias primas empleando para ello Espectroscopia de Absorción Atómica con Emisión de Flama previa digestión ácida de las muestras (ver Anexo 1.2).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7, donde se observa que el contenido de selenio total obtenido en la FES-C difiere del contenido de selenio referido por el proveedor Alltech México ( $P < 0.05$ ) mientras que para BioTecApSa de C.V. no hay diferencia ( $P > 0.05$ ) [ver Anexo 10]

Tabla 7. Contenido total de selenio de las levaduras enriquecidas.

PROVEEDOR	SELENIO TOTAL (PROVEEDOR)	SELENIO TOTAL (FESC UNAM)
BioTecApSa de C.V.	2000 mg Se/Kg	1992 mg Se/Kg
Alltech México	1000 mg Se/Kg	1278 mg Se/Kg

### 13.2.2. Determinación del contenido total de selenio en forraje

Se llevó a cabo la determinación del contenido total de selenio en el forraje (alfalfa) mediante EAAGH, previa digestión ácida de las muestras (ver Anexo 1.3) para determinar si el alfalfa poseía concentraciones adecuadas de selenio.

Se encontró que contiene 0.05 mg Selenio/Kg materia seca, es decir, el forraje es deficiente en el mineral. Esto último debido a que cuando los forrajes contienen más de 0.1 mg Selenio/Kg materia seca se consideran adecuados para cubrir las necesidades de este mineral en los animales (Meyer et al, 1999)

### 13.2.3. Ajustes a la formulación de los bolos

Con el objeto de aumentar el periodo de liberación de selenio de los bolos se llevaron a cabo algunas modificaciones a la formulación empleada para fabricar los bolos con Levinact® (ver Tabla 4).

En este caso, se fabricaron bolos con Sel-Plex™ y bolos con selenito de sodio, como fuentes de selenio. Las formulaciones se muestran enseguida.

Tabla 8. Formulación de los bolos con Sel-Plex™

COMPONENTE	%
Trióxido de Bismuto (Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	45.0
Cutina	20.0
Sel-Plex™	34.5
Estearato de magnesio	0.50

Tabla 9. Formulación de los bolos con Selenito de Sodio

COMPONENTE	%
Trióxido de Bismuto (Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	79.33
Cutina	20.0
Selenito de Sodio	0.17
Estearato de magnesio	0.50

Una vez realizados los ajustes correspondientes se fabricaron los bolos que serían utilizados para las pruebas *in vivo* del estudio comparativo. Los cálculos se hicieron de tal manera que cada bolo proporcionara una dosis diaria de 0.1 mg de selenio/kg de materia seca, considerando a un animal de 550 Kg de peso en promedio. Así los bolos tendrían una masa de 33.2 gramos aproximadamente con 11.454 g de levadura enriquecida ó 0.0564 g de selenito de sodio, equivalentes a 11.454 mg de selenio y 23.82 mg de selenio respectivamente. Los bolos con selenio de levaduras tuvieron una densidad promedio de 2.0 g/mL y los bolos con selenito de sodio de 3.4 g/mL.

### **13.2.4. Liberación *In Vivo***

#### **13.2.4.1. Perfiles plasmáticos de selenio**

Como parte del estudio comparativo se administraron algunos de los bolos fabricados a vacas lecheras de la raza Holstein, de 550 kilos de peso en promedio, estabuladas, para evaluar su comportamiento *in vivo*. Dicho estudio se llevó a cabo en el establo No. 210 del CAITSA en Tizayuca, Hidalgo.

Los animales se distribuyeron en tres grupos de 10 animales cada uno, el grupo testigo, el grupo al que se le administró el bolo con levaduras (Sel-Plex™) y el grupo al que se le administró el bolo con selenito de sodio.

Al realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se encontró un efecto significativo de los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, al efectuar los contrastes correspondientes, se encontró que no hay diferencia significativa entre los animales testigo y los animales suplementados ( $P > 0.05$ ) pero el selenio orgánico (Sel-Plex™) afecta la concentración de selenio en plasma de manera diferente al selenito de sodio ( $P < 0.05$ ), es decir, la concentración de selenio en plasma fue afectada por la forma

química de selenio administrada. En la Figura 11 se observa que, con respecto a los animales no suplementados, los animales suplementados con selenio orgánico tuvieron mayores concentraciones del mineral en plasma. Del mismo modo, hay efecto de la concentración inicial de selenio y del tiempo de muestreo sobre la concentración de selenio en plasma ( $P < 0.05$  para ambos casos) mientras que el número de partos no tuvo efecto significativo ( $P > 0.05$ ) sobre la respuesta observada [ver Anexo 11]. En la Figura 11 se muestran los perfiles plasmáticos promedio para los grupos de animales.

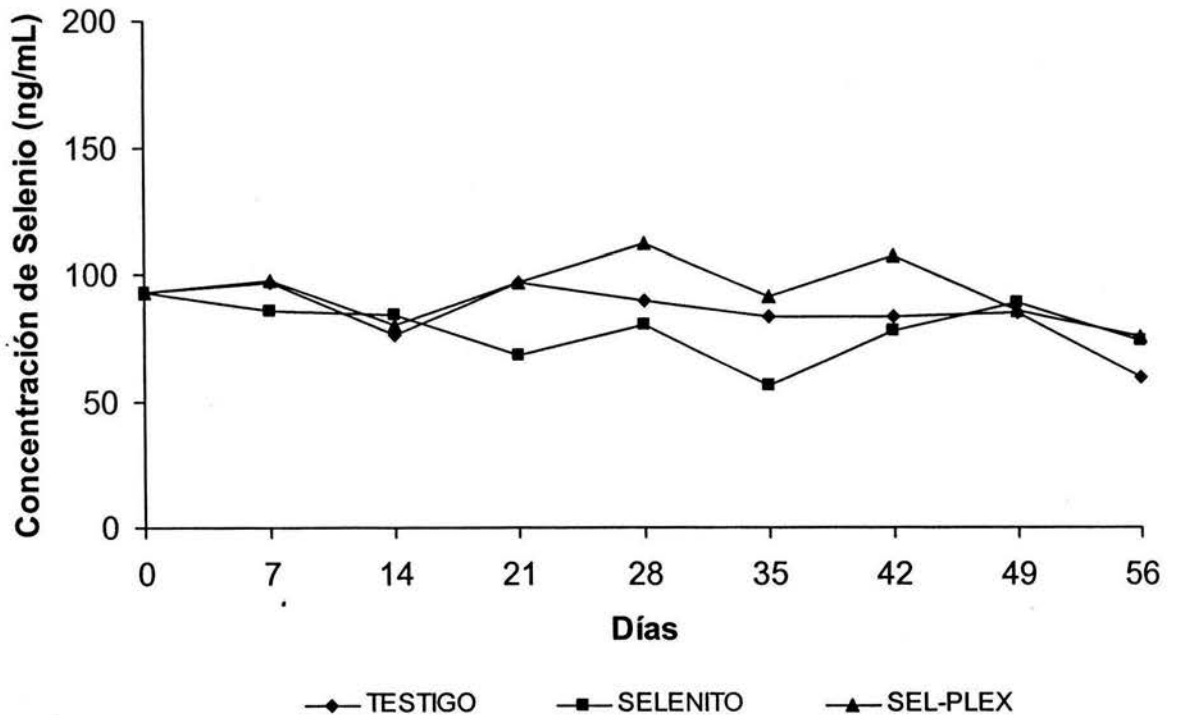


Figura 11. Efecto de la administración de bolos intrarruminales de liberación prolongada con dosis de 11.4 mg de selenio como selenio orgánico (Sel-Plex™) y 23.8 mg de selenio como selenio inorgánico (selenito de sodio) sobre la concentración de selenio en plasma de bovinos lecheros.



En la Fig. 11 se observa diferencia entre los tratamientos con respecto al grupo testigo así como entre los grupos de animales a los que se les administraron los bolos. En el caso de los animales testigo las concentraciones de selenio se mantuvieron prácticamente sin cambio mientras que en los animales a los que se le administró el bolo con selenito, la respuesta observada estaba por debajo de la del grupo testigo, mientras que en el caso de grupo tratado con Sel-Plex™ la respuesta observada estaba por arriba de la del grupo testigo, es decir hubo un marcado efecto del selenio orgánico sobre la concentración plasmática de selenio. Los animales testigo mantuvieron concentraciones de selenio entre 59 y 98 ng/mL mientras que las de los animales a los que se les administró selenito de sodio y selenio orgánico fluctuaron entre 56–89 ng/mL y 75–107 ng/mL respectivamente (ver Tabla 10). Todos los animales mantienen niveles adecuados del mineral en plasma aunque los tratados con el selenio orgánico son los únicos que mantienen estos niveles más constantes hasta el término del periodo de muestreo. Cabe mencionar que, los animales del grupo testigo recibieron suplementación de selenio con una mezcla mineral mientras que los animales tratados, además de dicha suplementación, se les administró el bolo. Por ello es que los animales testigo mostraron concentraciones adecuadas de selenio en plasma durante el periodo de muestreo aunque en la última muestra tomada la concentración de selenio disminuyó de 85 a 59 ng/mL mientras que en los animales con bolo también hubo una disminución en la concentración del mineral (de 89 a 74 ng/mL para el selenito de sodio y de 86 a 75 ng/mL para el Sel-Plex™) pero ésta aún se encontraba dentro de los límites aceptables lo que indica que, los animales próximos al parto requieren una dosis mayor de selenio que la administrada en la mezcla mineral y, en este caso, el selenio orgánico de levaduras sería la mejor opción ya que éste mantuvo los niveles más constantes y cercanos al considerado como adecuado por otros autores (Stowe and Herdt, 1992; Ellis et al., 1997). La disminución de las concentraciones de selenio en los grupos en estudio, después de dos meses de muestreo (Fig. 11) puede

ser debido a los requerimientos de selenio por parte del feto. Posiblemente este decremento, en conjunto con la dosis administrada, se deba al intercambio de selenio con el feto considerando que la caída ocurre al final del último tercio de gestación, cuando el crecimiento fetal es más importante (Faulkner, 1983). El selenio atraviesa la barrera placentaria y la glándula mamaria fácilmente (Enjalbert et al., 1999) y la acumulación de este elemento en el feto depende de las cantidades que tenga la madre. Además, las vacas en el último tercio de la gestación sufren deficiencia de selenio más frecuentemente que las vacas lactantes.

Finalmente, también puede corroborarse el efecto positivo del Sel-Plex™ al observarse concentraciones más elevadas de selenio que para el bolo con selenito de sodio (aún cuando éste último contenía 108% más selenio que el bolo con selenio orgánico (ver Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de selenio (ng/mL) en plasma de vacas Holstein bajo diferentes fuentes de suplementación de selenio

Fuente	Días de experimentación									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	X
Testigo <sup>1</sup>	98	97	76	97	90	83	83	85	59	84
Selenito de Sodio <sup>2</sup>	80	86	84	68	80	56	78	89	74	77
Sel-Plex <sup>3</sup>	100	98	80	97	112	91	107	86	75	93
	X	93	94	80	87	94	77	89	87	69

<sup>1</sup> Los animales recibieron en la dieta 0.5% de una mezcla mineral (Biofos® Plus)

<sup>2</sup> Los animales recibieron, además de la mezcla mineral de los animales testigo, un bolo de 33.2 de peso en promedio con 11.4 mg de selenio como selenio inorgánico (Selenito de Sodio)

<sup>3</sup> Los animales recibieron, además de la mezcla mineral de los animales testigo, un bolo de 33.2 de peso en promedio con 23.8 mg de selenio como selenio orgánico (Sel-Plex™)

Por otro lado, hay efecto del tiempo de muestreo a la primera y a la quinta potencia ( $P < 0.5$  en ambos casos) sobre la respuesta observada (concentración de selenio). Pero, dado que no existe interacción entre los tratamientos y el tiempo de muestreo, este efecto del tiempo podría indicar que factores externos pudieron ocasionar que no hubiese un efecto bien definido del tiempo de muestreo sobre la respuesta observada así como sobre la interacción. Dichos factores pudieron ser: el estrés al que fueron sometidos los animales durante el muestreo ya que se pasaban de un corral a otro para efectuarlo; el período de muestreo, ya que éste se realizó durante los meses de mayo a agosto y en estos meses el clima estuvo muy variable (cuando dio inicio el experimento estaba lloviendo y esto ocasionó una disminución en la temperatura ambiental, particularmente por las mañanas y esto también ocasiona estrés fisiológico en el animal); el número de partos de los animales también pudo influir ya que a mayor número de partos mayor requerimientos de nutrientes y no sólo eso, además la masa fetal y la de la placenta así como su demanda de energía, proteínas y minerales aumenta dramáticamente al aumentar la edad gestacional (Bell et al, 1995; House, 1993); y, finalmente, también los cambios de alimentación ya que ésta cambio cuatro veces durante el período de muestreo y la adaptación a ésta también ocasiona cambios en el metabolismo del animal.

En la tabla 10 se observa claramente que la concentración de selenio disminuye conforme pasa el tiempo de muestreo para todos los grupos en estudio aunque al final de éste, la concentración de selenio aún es adecuada. Esta disminución en la concentración del mineral en plasma es atribuible a la etapa en la que se encontraban los animales (último tercio del período de gestación) ya que los periodos del parto y la lactancia son críticos para la salud de las vacas lecheras. La fiebre de la leche, la placenta retenida, mastitis, etc., son algunos desordenes a los que puede contribuir el estrés oxidativo, de ahí la necesidad de la suplementación con los nutrientes conocidos que son necesarios para el sistema de defensa antioxidante (Miller et al, 1993). Además, la transición del

estado gestante no lactante al estado no gestante lactante es a menudo una experiencia estresante para la vaca. La mayoría de las enfermedades metabólicas de las vacas lecheras ocurren durante las dos primeras semanas en lactación (Goff, 1997). Finalmente, el grupo tratado con Sel-Plex™ mostró menos fluctuación en las concentraciones de selenio con respecto al grupo tratado con selenito de sodio lo que una vez más denota la superioridad de éste con respecto al selenio inorgánico (Combs, 1986; Ortman y Pehrson, 1999), por ejemplo, McDowell et al. (1997), indica que el selenio orgánico ofrece un aporte constante de selenio y da el más elevado del mineral en vacas.

#### **13.2.5. Actividad de la enzima GSH-Px en plasma**

El análisis estadístico de los datos obtenidos mostró que no hubo efecto de la dosis de selenio administrada en los bolos sobre la actividad de la enzima, ni de la actividad inicial de la enzima en plasma y del número de partos ( $P > 0.05$  para los tres casos). Sólo es significativo el efecto principal del tiempo ( $P < 0.05$ ). Del mismo modo, no hubo diferencia entre la actividad de la GSH-PX en el plasma del grupo de animales del bolo con selenito de sodio con respecto a la del grupo de los animales del bolo con Sel-Plex™ ( $P > 0.05$ ). [ver Anexo 12].

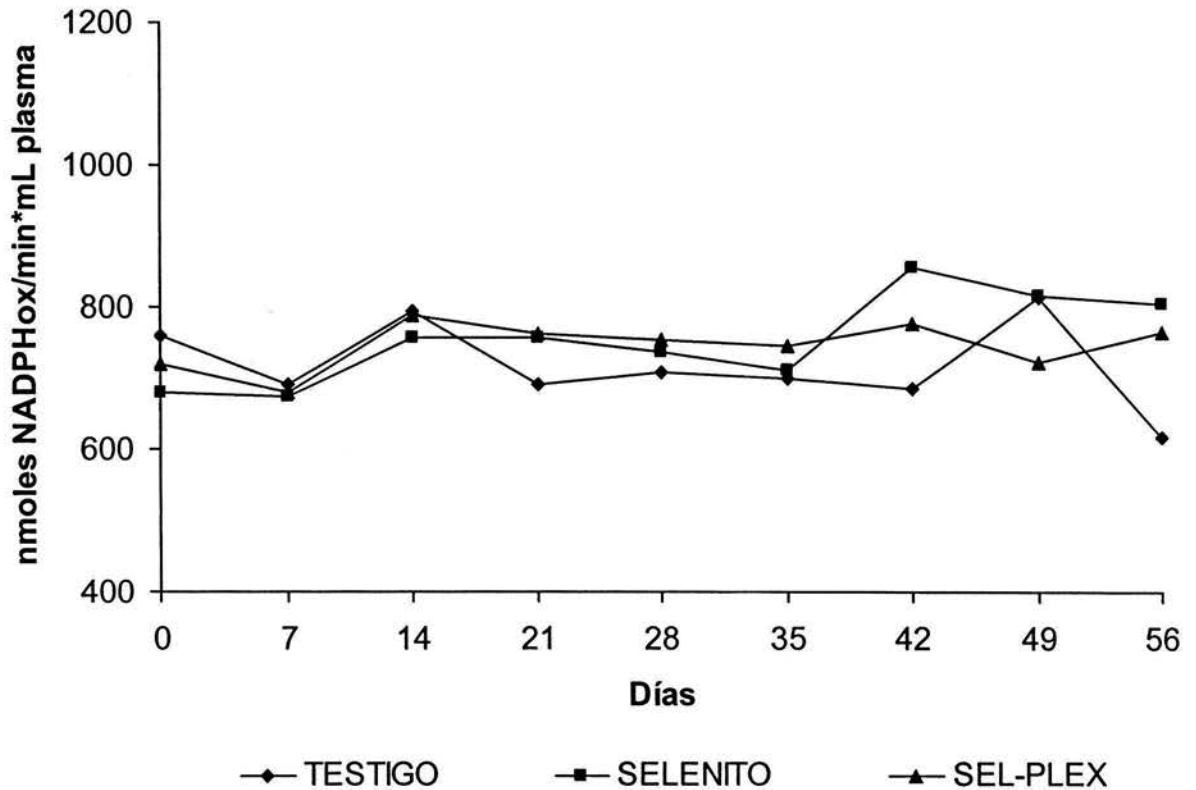


Figura 12. Efecto de la administración de bolos intrarruminales de liberación prolongada con dosis de 11.4 mg de selenio como selenio orgánico (Sel-Plex™) y 23.8 mg de selenio como selenio inorgánico (selenito de sodio) sobre la actividad de la GSH-Px en plasma de bovinos lecheros.

En la Figura 12 se observa que los valores iniciales de la actividad de la enzima para todos los grupos no difieren mucho uno de otro, por lo cual no afectan la respuesta observada durante el periodo de muestreo. Además, la administración del bolo tampoco tuvo efecto sobre la respuesta ya que la actividad de la enzima es muy similar para todos los grupos (ver Tabla 11) aún así el Sel-Plex™ mantiene la actividad enzimática más constante mientras que el selenito aunque muestra mayores actividades enzimáticas no lo hace de manera constante como el selenio orgánico. Finalmente, el tiempo tuvo efecto a la cuarta potencia sobre la actividad de la enzima ( $P < 0.05$ ), por ello se observa esa variación a través del tiempo. Pero, dado que la interacción del tiempo con los tratamientos no es

significativa, no es posible determinar la potencia del efecto del tiempo para cada tratamiento. No obstante, el hecho de que hubiera efecto del tiempo indica que, al igual que con las concentraciones de selenio en el plasma, los factores clima, alimentación y número de partos influyeron para que la interacción tiempo\*tratamiento no fuera significativa.

Tabla 11. Actividad de la GSH-Px (nmoles NADPH ox/min\*mL plasma) de vacas Holstein bajo diferentes fuentes de suplementación de selenio

Fuente	Días de experimentación									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	X
Testigo <sup>1</sup>	759	690	792	692	708	698	685	813	619	717
Selenito de Sodio <sup>2</sup>	680	674	757	755	736	710	856	816	804	754
Sel-Plex <sup>3</sup>	719	680	788	763	753	745	775	722	764	745
X	719	681	779	737	732	718	772	784	729	

<sup>1</sup> Los animales recibieron en la dieta 0.5% de una mezcla mineral (Biofos® Plus)

<sup>2</sup> Los animales recibieron, además de la mezcla mineral de los animales testigo, un bolo de 33.2 de peso en promedio con 11.4 mg de selenio como selenio inorgánico (Selenito de Sodio)

<sup>3</sup> Los animales recibieron, además de la mezcla mineral de los animales testigo, un bolo de 33.2 de peso en promedio con 23.8 mg de selenio como selenio orgánico (Sel-Plex™)

En la Tabla 11 se observa claramente que la actividad de la enzima GSH-Px del grupo testigo disminuye con el paso del tiempo, lo que una vez más indica que aún cuando los animales reciban una mezcla mineral en la dieta requieren una dosis adicional de selenio para mantener su sistema de defensa antioxidante en niveles adecuados. En este caso, el grupo de animales con el bolo con selenio inorgánico tuvieron una actividad enzimática similar a la obtenida con el selenio orgánico. Lo anterior significa que ambas formas químicas de selenio afectan del mismo modo la actividad de la enzima; pero para ello el selenito debe de ir en una dosis 108% mayor a la de Sel-Plex™.

### 13.2.6. Correlación entre la concentración de selenio y la actividad de la GSH-Px en plasma.

El análisis estadístico reveló que no existe correlación significativa entre las variables (ver Fig. 13 y Fig. 14). En el caso del grupo de animales con el bolo con selenito de sodio el valor del coeficiente de Pearson es  $r = 0.014$  ( $P > 0.05$ ) y para el grupo de animales con el bolo con Sel-Plex™,  $r = -0.08$  ( $P > 0.05$ ) (ver Anexo 13). Cabe mencionar que existen muchos métodos diferentes para determinar la actividad de la GSH-Px y cada uno produce diferentes resultados numéricos, sobre todo por tratarse de una reacción enzimática (Ellison, 1992) es por ello que se atribuye que los resultados obtenidos en el presente estudio no concuerdan con estudios preliminares que indican que existe una alta correlación entre la concentración de selenio y la actividad de la enzima GSH-Px en plasma; así, se ha observado una correlación de 0.9 ( $P < 0.05$ ) (Erskine, et al., 1987) o de 0.83 ( $P < 0.05$ ) (Ceballos, et al., 1999) aún cuando todos tomamos como referencia lo encontrado por Paglia y Valentine (1967).

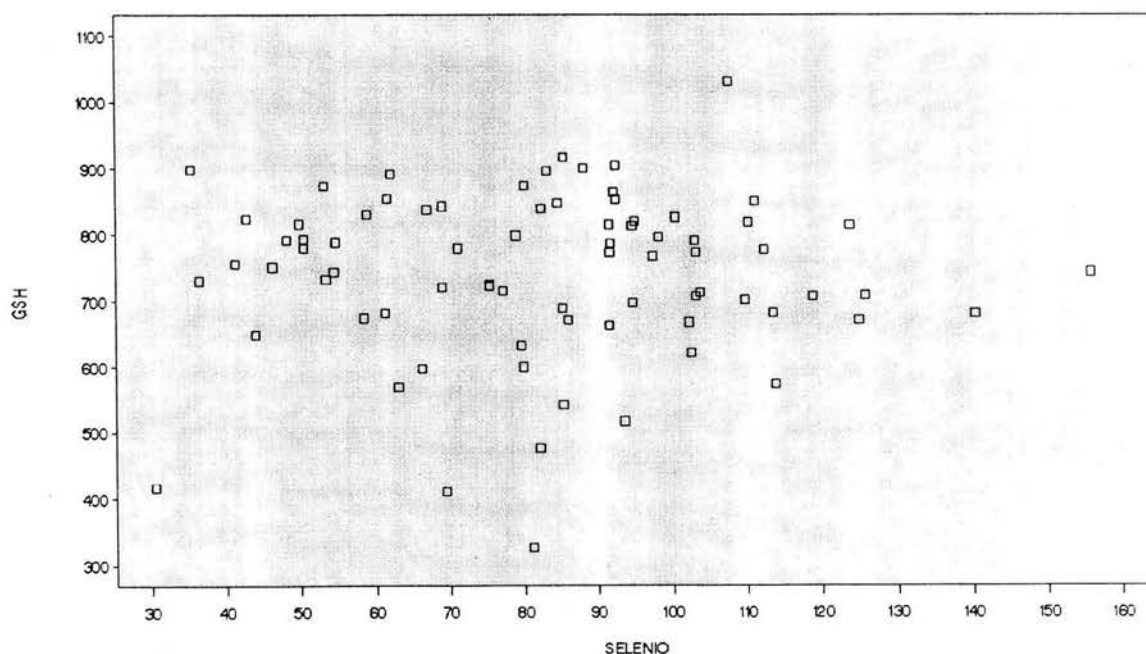


Figura 13. Correlación entre la concentración de selenio (ng/mL) y la actividad de la GSH-Px (nmol NADPH ox/min\*mL plasma) en plasma de bovinos lecheros después de 56 días de tratamiento (bolo con selenito).



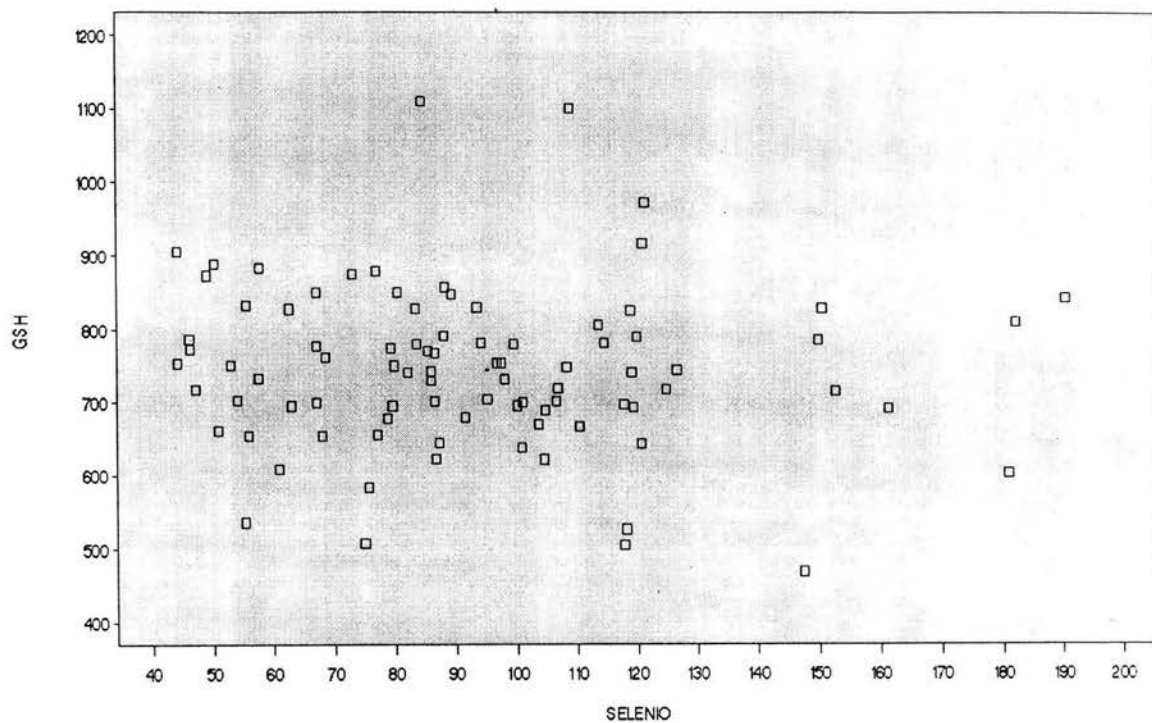


Figura 14. Correlación entre la concentración de selenio (ng/mL) y la actividad de la GSH-Px (nmol NADPH ox/min\*mL plasma) en plasma de bovinos lecheros después de 56 días de tratamiento (bolo con Sel-Plex).



**Conclusiones**

## 14. Conclusiones

- La formulación desarrollada es adecuada para la fabricación de bolos de liberación prolongada con selenio orgánico o selenio inorgánico.
- El bolo administrado intrarruminalmente, a bovinos productores de leche, en periodo de lactancia y en el último tercio del periodo de gestación, es efectivo para mantener las concentraciones de selenio en plasma en el rango considerado como adecuado.
- Los bolos con selenito de sodio son tan efectivos como los bolos con selenio orgánico de levaduras para mantener las concentraciones de selenio en plasma pero con una cantidad 108% mayor de selenio con respecto al selenio orgánico en bovinos productores de leche en el último tercio del periodo de gestación.
- Los bolos fabricados con selenio orgánico y los con selenito de sodio no mostraron un efecto significativo sobre la actividad de la enzima GSH-Px pero dicha actividad permaneció más constante con respecto a los animales no suplementados.
- No existe correlación entre la concentración de selenio y la actividad de la enzima GSH-Px en plasma en animales en el último tercio del periodo de gestación.

# Referencias

---

## Referencias

1. Abdelrahman M. M., Kincaid R. L. Effect of Selenium Supplementation of Cows on Maternal Transfer of Selenium to Fetal and Newborn Calves. *J Dairy Sci* 1995; 78(3): 625 - 630.
2. Allen W. M., Mallison C. B. Parenteral Methods of Supplementation with Copper and Selenium. *Vet Rec* 1984; 114: 451-454.
3. Alltech, Inc. Sel-Plex™ Redefining Selenium Supplementation (Interactive Minidisk). Alltech, Inc., 2000.
4. Aluja, A. S., Adame P. Miopatía Degenerativa en Becerros. *Vet Méx* 1977; 8: 2-12.
5. Aluja, A. S. De; A. M. Rocha y P. Ochoa. Determinación de Niveles de Selenio Sérico en Becerros y Vacas de dos Establos Localizados en el Estado de México. *Vet Méx* 1981; 12(2):85-88.
6. Ammerman C. B., Baker D.H. D., Laustin J. L. Bioavailability of Nutrients for Animals. Aminoacids, Minerals and Vitamins. USA: Academic Press, 1995
7. Arnold R. N., Arp S. C., Sheller K. K., Williams S. N., Shaefer D. M. Tissue Equilibration and Sub cellular Distribution of Vitamin E Relative to Myoglobin and Lipid Oxidation in Displayed Beef. *J Anim Sci*, 1993; 71: 105-118.
8. Arthur J. R. The Biochemical Function of Selenium: Relationships to Thyroid Metabolism and Antioxidant Systems. In: Rowett Research Institute Annual Report. Buckburn. Aberdeen, UK. 1993
9. Awadeh F. T., Kincaid R. L., Johnson, K. A. Effect of Level and Source of Dietary Selenium on Concentrations of Thyroid Hormones and Immunoglobulins in Beef Cows and Calves. *J Anim Sci*, 1998; 76:1204-1215.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

10. Barradas, H. V. Interrelationships Among the Mineral Content of the Soils, Forages and Cattle in the Central and Northern Region of Veracruz, México. (M. Sc. Thesis) Michigan USA: Michigan State University, 1980.
11. Bell A. W., Slepatis R., Ehrhardt R. A. Growth and Accretion of Energy and Protein in the Gravid Uterus during Late Pregnancy in Holstein Cows. *J Dairy Sci* 1995; 78: 1954
12. Bligh J. Temperature Regulation. In: *Stress Physiology of Livestock*. Boca Raton Florida : CRC Press, 1984.
13. Blodinger J. Formulation of Veterinary Dosage Forms. In: *Formulation of Drug Dosage Forms for Animals*. New York: Marcel Decker, 1983: 135-173.
14. Board P. G., Peter D. W. A Simple Test for Glutathione Peroxidase and Selenium Deficiency. *Vet Rec* 1976; 94:144.
15. Bock, A. et al. Microreview : Selenocysteine : the 21st Amino Acid. *Molecular Microbiology* 1991; 5(3): 515-520.
16. Brody T. *Nutritional Biochemistry*. New York: Academic Press, 1994
17. Burk R. F. Molecular Biology of Selenium with Implications of its Metabolism *FASEB J* 1991; 5:2274-2279
18. Buttler G. W., Peterson P. J. Aspects of the Faecal Excretion of Selenium by Sheep. *N Z J Agric Res* 4:484-491.
19. Campbell D. T., Maas J., et al. Safety and Efficacy of Two Sustained-Release Intra-Reticular Selenium Supplements and the Associated Placental and Colostrum Transfer of Selenium in Beef Cattle. *Am J Vet Res* 1990; 51(5): 813 - 817.
20. Ceballos A., Wittwer F., Contreras P., et al. Actividad de Glutatión Peroxidasa en Bovinos Lecheros a Pastoreo Correlacionada con la Concentración Sanguínea y Plasmática de Selenio. *Pesq. Agropec. Bras.* 1999; 34(12): 2331 - 2338.

21. Chassaing H., Chéry C. C., Bordin G., Rodríguez A. Development of New Analytical Methods for Selenium Speciation in Selenium-Enriched Yeast Material. *J Chromatography A* 2002; 976: 409 - 422.
22. Church D. C., Pond W. G. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. México: LIMUSA, 1992
23. Clark L. J., Falminton A. B., Wright A. B., Isherwood P., Baas E. Selenium Field Trials in Dairy Cattle. Proc. of the 22<sup>nd</sup>. Seminar Sheep and Beef Cattle Society; 1992. New Zealand Veterinary Association Incorporating the NZVA Conference. Publication No. 154. Pp. 27-31.
24. Combs G. F., Combs S. B. Absorption and Transfer. In: *The Role of Selenium in Nutrition*. New York: Academic Press, 1986.
25. Daniels L. A. Selenium Metabolism and Bioavailability. *Biol Trace Elem Res* 1996; 54: 185.
26. De Blas C., González M, Argamenteria A. *Nutrición y Alimentación del Ganado*. España: Ediciones Mundi-Prensa, 1986.
27. Díaz, S. R. Montes de Oca, V. Velázquez y J. Wilsmore. Actividad de Glutación Peroxidasa (GSH-Px) y Niveles de Selenio en Sangre de Ovinos y Niveles de Selenio en Suelo y Pasto de Áreas Ovinas. *Memorias de XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*; 1994: 237. Acapulco (Guerrero) México, 1994.
28. Diplock A. T., Caygill C. P., Jeffrey E. H., Thomas C. The Nature of the Acid-volatile Selenium in the Liver of the Male Rat. *Biochem J* 1973; 134: 283.
29. Donald G. E., Langlands J. P., et al. Selenium Supplements for Grazing Sheep. Development of an Intra-Ruminal Pellet with and Extended Life. *Anim Feed Sci Technol* 1993; 40:295-308.

- 
30. Edens F. W. Aplicaciones Prácticas de la Selenometionina en Aves Reproductoras. En: Navegando de Mercado Nicho a Mercados Globales. 12ª Ronda Latinoamericana de Alltech. Del 23 de septiembre al 4 de octubre del 2002. Alltech, Inc. Pp. 20 - 22.
  31. El-Bayoumy K. The Protective Role of Selenium on Genetic Damage and on Cancer. *Mutation Research* 2001; 475:123-139.
  32. Ellis R. G., Herdt T. H., Stone H. D. Physical, Hematologic, Biochemical and Immunologic Effect of Supranutritional Supplementation with Dietary Selenium in Dairy Cows. *Am J Vet Res* 1997; 58: 760 - 764.
  33. Ellison R. S. A Review of Copper and Selenium Referent Ranges in Cattle and Sheep. *Proceeding of the 22nd Seminar Sheep and Beef Cattle Society. New Zealand Veterinary Association Incorporating the NZVA Conference.* 1992; 154: 3-17.
  34. Enjalbert F., Lebreton P., Salat O., Schelcher F. Effect of Pre- or Postpartum Selenium Supplementation on Selenium Status in Beef Cows and Their Calves. *J Anim Sci* 1999; 77: 223 - 229.
  35. Erskine R. J., Eberhart R. J., Hutchinson L. J., Scholz R. W. Blood Selenium Concentrations and Glutathione Peroxidase Activities in Dairy Herds with High and Low Somatic Cell Counts. *J Am Vet Med Ass* 1987; 190(11): 1417 - 1421.
  36. Escobosa, A. González M.O., Rocha A. M., et al. Determinación de Selenio, Calcio, Fósforo y Manganeso en Forrajes y pH de Suelos en Algunas Regiones de la República Mexicana. *Memorias X Congreso Nacional de Buiatría; México.* 1978: 839.
  37. Fassbender H. W., Bornemiza E. *Química de Suelos con Énfasis en Suelos de América Latina.* Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica, 1987.

- 
38. Faulkner A. Fetal and Neonatal Metabolism. In: Nutritional Physiology of Farm Animals. UK: Longman Group Burnt Mill, 1983: 203 - 241.
  39. Fisher R. A., Yates F. Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. 6<sup>th</sup>. Great Britain: Oliver and Boyd Ltd., 1963.
  40. Gerloff B. J. Effect of Selenium Supplementation on Dairy Cattle. J Anim Sci 1992; 70:3934-3940.
  41. Gissel-Nielsen G. General Aspects of Selenium Fertilization. Nor J Agric Sci Suppl 1993; 11: 135 - 140.
  42. Gilon N., Potin-Gautier M., Astruc M. Optimization of the Determination of Inorganic and Organic Selenium Species Using HPLC-Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. J. Chromatography A. (1996) 750. Pp. 327-334.
  43. Gleason H. M. Desarrollo y Optimización de los Métodos de Digestión Ácida en Horno de Microondas para la Cuantificación de Selenio en Plasma y Leche de Ganado Vacuno (Tesis de Licenciatura). Cuautitlán Izcalli (México) México: UNAM, 2004. En prensa.
  44. Goessler W., Kuehnelt D., et al. Retention Behavior of Inorganic and Organic Selenium Compounds on a Silica-based Strong-cation-exchange Column with an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer a Selenium-Specific Detector. J. Chromatography A. 1997; 789:233-245.
  45. Goff J. P., Horst R. L. Physiological Changes at Parturition and their Relationship to Metabolic Disorders. J. Dairy Sci. 1997; 80:1260 - 1268.
  46. Gyurik Robert J. Rumen Retention Devices in Drug Delivery Devices. Fundamentals and Applications, Editado por Praveen Tyle, New York: Marcel Decker, 1983: 549-561.
  47. Harrison J. H., Conrad H. R. Effect of Calcium on Selenium Absorption by the Nonlactating Dairy Cow. J Dairy Sci 1984a; 67: 1860 - 1864.



48. Harrison J. H., Conrad H. R. Effect of Selenium Intake on Selenium Utilization by the Nonlactating Dairy Cow. *J Dairy Sci* 1984b; 67: 219 – 223.
49. Hansard, S. M. Microminerals for Ruminant Animals. *Nutr Abs Rev Series B* 1983; 53: 1-24.
50. Heider J., Böck A. Selenium Metabolism in Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology* 1993; 35: 98– 99.
51. Hidioglou M, Heaney D. P., Jenkins K. J. Metabolism of Inorganic Selenium in Rumen Bacteria. *Can J Physiol Pharm* 1968; 46:229.
52. Hidioglou M, Prolux J., Jolette J. Effect of Intraruminally Administered Selenium Soluble-Glass Boluses on Selenium Status in Cows and their Calves. *J Anim Sci* 1987; 65:815–820.
53. Hill K. E., Burk R. F., Lane J. M. Effect of Selenium Depletion and Repletion on Plasma Glutathione and Glutathione-dependent Enzymes in the Rat. *J Nutr* 1987; 117: 99–104.
54. Hoekstra W. G. Biochemical Function of Selenium and Its Relation to Vitamin E. *Fed Proc* 1975; 34: 2083.
55. House W. A., Bell A. W. Mineral Accretion in the Fetus and Adnexa during late Gestation in Holstein Cows. *J Dairy Sci* 1995; 76:2999
56. Hudman J. F., Glenn A. R. Selenite Uptake and Incorporation by *Selenomonas ruminantium*. *Arch Microbiol* 1984; 140:252–256.
57. Hurley W. L., Doane R. M. Recent Developments in the Roles of Vitamins and Minerals in Reproduction. *J Dairy Sci* 1989; 72: 784–804.
58. Judson G. H., Ellis N. F., Kempe B. R., Shallow M. Long-acting Selenium Treatments for Sheep. *Aust Vet J* 1991; 68(8): 263 – 265.
59. Kabata-Pendias A., Pendias H. Trace Elements in Soils and Plants. Boca Raton Ann Arbor London: CRC Press, 1992: 78–226.

- 
60. Kelly M. P., Power R. F. Fractionation and Identification of the Major Selenium Containing Compounds in Selenized Yeast. *J Dairy Sci* 1995; 78(Suppl):237.
  61. Kendall N. R., McMullen S. et al. The Effect of a Zinc, Cobalt and Selenium Soluble Glass Bolus on Trace Element Status and Semen Quality of Ram Lambs. *Anim Rep Sci* 2000; 62: 277 - 283.
  62. Kendall N. R., Mackenzie A. M., Telfer S. B. Effect of a Copper, Cobalt and Selenium Soluble Glass Bolus given to Grazing Sheep. *Livestock Production Science* 2001; 68: 31 - 39.
  63. Kim J., Van Soest P. J., Combs G. F. Studies the Effects of Selenium on Rumen Microbial Fermentation In Vitro. *Biol Trace Elem Res* 1997; 56:203-213.
  64. Kincaid R. The Biological Basis for Selenium Requirements of Animals. *Professional Animal Scientist* 1995; 11: 26-29.
  65. Knowles S. O., Grace N. D., Lee J. Significance of Amount and Form of Dietary Selenium on Blood, Milk and Casein Concentrations in Grazing Cows. *J Dairy Sci* 1999; 82:429-437.
  66. Köhrle J. The Trace Element Selenium and the Thyroid Gland. *Biochimie* 1999; 81:527-533
  67. Korening K. M., Buckley W. T., Shelford A. Measurement of Endogenous Fecal Excretion and True Absorption of Selenium in Dairy Cows. *Can J Anim Sci* 1991; 71: 167-174.
  68. Kotrebai M., Bird S., et al. Characterization of Selenium Species in Biological Extracts by Enhanced Ion-pair Chromatography with Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry and by Referenced Electrospray Ionization-mass Spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 1999; 54:1573-1591.
  69. Kuehl R. O. *Diseño de Experimentos. Principios Estadísticos de Diseño y Análisis de Investigación*. 2ª. México: Thomson Editores, 2001.

- 
70. Langlands J. P., Bowles G. E., Donald G. E., Smith A. J. Selenium Excretion in Sheep. *Aust J Agric Res* 1986; 37: 20-209.
  71. Levander O. A. Metabolic Interrelationships Between Arsenic and Selenium. *Environ Health Persp* 1977; 19: 159.
  72. Levander O. A. Selenium. In: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. 5<sup>th</sup>. Volume 2. Florida: Academic Press, 1986: 209 - 279.
  73. Littell R. C., Henry P. R., Ammerman C. B. Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures. *J Anim Sci* 1998; 76: 1216-1231.
  74. London J. R. *Booker Tropical Soil Manual*. Longman Scientific and Technical Booker, 1991:155-172.
  75. Lyons T. P. Navegando desde los Nichos de Mercado hasta la Corriente Principal: Una Industria de Alimentos Kakumei. En: *Navegando de Mercado Nicho a Mercados Globales*. 12<sup>a</sup> Ronda Latinoamericana de Alltech. Del 23 de septiembre al 4 de octubre del 2002. Alltech, Inc. Pp. 14
  76. Mahan D. C. Organic Selenium: Using Nature's Model to Redefine Selenium Supplementation for Animals. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. Loughborough, Leicester, UK: Nottingham Univ. Press. 1999: 523- 535.
  77. Mahan D. C., Cline T.R., Richert B. Effects of Dietary Levels of Selenium-Enriched Yeast and Sodium Selenite as Sources Fed to Growing-Finishing Pigs on Performance, Tissue Selenium, Serum Glutathione Peroxidase Activity, Carcass Characteristics, and Loin Quality. *J Anim Sci* 1999; 77(8):2172-2178.
  78. Mahan D. C. Effect of Organic and Inorganic Selenium Sources and Levels on Sow Colostrum and Milk Selenium Content. *J Anim Sci* 2000; 78(1): 100-105.
  79. Marschner H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Institute of Plant Nutrition University. USA: Academic Press, 1986: 364-367.

- 
80. Masters D. G., Peter D. W. Marginal Deficiencies of Cobalt and Selenium in Weaner Sheep: Response to Supplementation. *Aust J Agric Res* 1990; 30: 337 - 341.
  81. Maus R. W., Martz F. A., et al. Relationship of Dietary Selenium to Selenium in Plasma and Milk from Dairy Cows. *J Dairy Sci* 1980; 63: 532 - 537.
  82. McDowell L. R. Trace Elements Supplementation in Latin America and the Potential for Organic Selenium. *Proc. Alltech 13<sup>th</sup> Annual Biotechnology in the Feed Industry*, 1997: 45 (Abstract)
  83. Millar K. R., Meads W. J. Selenium Levels in the Blood, Liver, Kidney and Muscle of Sheep after the Administration of Iron/Selenium Pellets or Soluble-Glass Boluses. *N Z Vet J* 1988; 36:8-10.
  84. Millar K. R., Meads W. J., et al. The Retention and Efficacy of Soluble-Glass Boluses for Providing Selenium, Cobalt and Copper to Sheep. *N Z Vet J* 1988; 36:11-14.
  85. Miller J. K., Brzezinska-Slebodzinska E., Madsen F. C. Oxidative Stress, Antioxidants and Animal Function. *J Dairy Sci* 1993 76:2812 - 2823.
  86. Montgomery D. C. *Diseño y Análisis de Experimentos*. México: Grupo Editorial Iberoamérica, 1991.
  87. Neter J., Kutner M. H., et al. Repeated Measures and Related Designs. *Applied Linear Statistical Models*. 4<sup>th</sup>. Chapter 29. McGraw-Hill, 1996:1164-1206.
  88. NRC (1980) *The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock*. National Academy Press, Washington, D. C.
  89. NRC (1983) *Selenium in Nutrition*. National Academy Press, Washington, D. C.
  90. NRC (1987) *Vitamins Tolerance of Animals*. National Academy Press. Washington, D. C. Pp. 23-30.
  91. Olfield J. E. Observations on the Efficacy of Various Forms of Selenium for Livestock. *A Review Biom Environmental Sci* 1997; 10:280 - 291.

- 
92. Ordóñez R. J. A., Velázquez O. V., Rosiles M. R. Niveles de Selenio, Cobre y Cobalto en Suelo y Forraje y su Importancia sobre los Problemas de Deficiencia en Corderos Alimentados bajo Condiciones de Pastoreo en San Felipe del Progreso, Estado de México. *Memorias del III Congreso Nacional de Producción Ovina*, 1990: 92-95.
  93. Ortman K., Pehrson B. Selenite and Selenium Yeast as Feed Supplements for Dairy Cows. *J Vet Med A* 1997; 44:373-380.
  94. Ortman K., Pehrson B. Effect of Selenate as a Feed Supplement to Dairy Cows in Comparison to Selenite and Selenium Yeast. *J Anim Sci* 1999; 77:3365-3370.
  95. Paglia D. E., Valentine W. N. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1): 158-169.
  96. Paulson G. D., Baumann C. A., Pope A. L. Fate of a Physiological Dose of Selenate in the Lactating Ewe: Effect of Sulfate. *J Anim Sci* 1966; 25:1054.
  97. Paulson G. D., Baumann C. A., Pope A. L. Metabolism of <sup>75</sup>Se-selenite, <sup>75</sup>Se-selenate, <sup>75</sup>Se-selenomethionine and <sup>35</sup>S-sulfate by Rumen Microorganism in Vitro. *J Anim Sci* 1968; 27:497.
  98. Pehrson B., Ortman K., et al. The Influence of Dietary Selenium as Selenium Yeast or Sodium Selenite on the Concentration of Selenium in the Milk of Suckler Cows and on the Selenium Status of their Calves. *J Anim Sci* 1999; 77:3371-3376.
  99. Pérez M. S., Blanco G. E., Sanz-Medel A. Enantiomeric Separation of Selenoaminoacid Derivatives by Ciclodextrin-modified Micellar Electrokinetic Chromatography Using a Mixed Micellar System of Sodium Dodecyl sulphate and Taurodeoxycholic Acid. *Analytica Chimica Acta* 2000; 426:1-7.
  100. Podoll K. L., Bernard D. E., Ullrey D. E., De Bar S. R., Ku P. K., Magee W. T. Dietary Selenate Versus Selenite for Cattle, Sheep and Horses. *J Anim Sci* 1992; 70: 1965 - 1970.

- 
101. Pope D. G., Wilkinson P. K., Egerton J. R. & Conroy J. Oral Controlled-Release Delivery of Ivermectin in Cattle Via an Osmotic Pump. *J Pharm Sci* 1985; 74(10): 1108 - 1110.
  102. Porter E. K., Karle J. A. Shrift A. Uptake of Selenium-75 by Human Lymphocytes In Vitro. *J Nutr* 1979; 109: 1901.
  103. Ramírez B. J. La Carencia de Selenio, su Diagnóstico y Suplementación en un Sistema de Producción Caprina en el Sureste del estado de Tlaxcala (Tesis Maestría). Cuautitlán Izcalli (México) México: UNAM, 1995.
  104. Reilly Conor. Selenium: A new Entrant into the Functional Food Arena. *Trends in Food Science & Technology* 1998; 9: 114 - 118.
  105. Rock M. J., Kincaid R. L., Carstens G. E. Effects of Prenatal Source and Level of Dietary Selenium on Passive Immunity and Thermometabolism of Newborn Lambs. *Small Rum Res* 2001; 40: 129 - 138.
  106. Rosemary H. N. Selenium. *Heavy Metals in Soils*. Glasgow and London, 1990: 237-260.
  107. Rosiles M. R.; González R. R., et al. Niveles Comparativos de Selenio en Pelo de Bovinos Sanos a Nivel del Mar, con los de Insuficiencia Cardiaca en el Valle de México. *Vet Méx* 1993; 24(2):135-137.
  108. Rosiles M. R.; Gutiérrez O., Valdez A. R. Liberación de Selenio in Vitro a partir de Bolos Minerales con Cuatro Tipos de Cemento Adhesivo y en pH 7.0, 6.5, 6.0 y 5.5. *Vet Méx* 1998; 29(3):257-261.
  109. Sánchez H. P. Determinación de Niveles de Selenio en Algunos Factores Nutricionales que Inducen la Intoxicación Crónica por Selenio en dos Áreas de la Comarca Lagunera (Tesis de Licenciatura) México (DF.) México: UNAM, 1978.

- 
110. Sarkar S., Das K. C., Chowdhury S. P., Bhowmik M. K., Mukherjee B. N. Effect of Certain Micromineral Status in the Soils and Forages of Lluvian Tropics on the Incidence of Nutritional Anemia in Grazing Sheep. *Indian J Anim Sci* 1992; 62: 665 - 669.
  111. Schrauzer G. N. Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. *J Nutr* 2000; 130: 1653 - 1656.
  112. Serra A. B., Serra S.D. et al. Effect of Selenium in Soluble Glass Bolus on Selenium Content of Milk and Blood of Goats. *Biol Trace Elem Res* 1996; 55:207-211.
  113. Serra A. B., Serra S. D., T. Fujihara. Influence of Dietary Protein on the Fractionation of Selenium in the Rumen of Sheep. *Aust J Am Stud* 1996; 9(5): 557-562.
  114. Serra A. B., Serra S. D., Kousei S., Fujihara T. Bioavailability of Rumen Bacterial Selenium in Mice Using Tissue Uptake Technique. *Biol Trace Elem Res* 1997; 58:255-261.
  115. Sheppard A. D., Millar K. R. Stability of Glutathione Peroxidase in Ovine Blood Samples under Various Storage Conditions and the Response of this Enzyme to Different Methods of Selenium Supplementation. *N Z Vet J*.1981; 29: 77 - 80.
  116. Smith K. L., Hogan J. S., Conrad H. R. Selenium in Dairy Cattle: Its Role in Disease Resistance. *Vet Med* 1988; 83: 72 - 78
  117. Spross, S. A. Evaluación del Contenido Mineral en Suelo, Planta y Animal, de Cinco Ranchos del Estado de México y Estado de Hidalgo (Tesis de Maestría) Cuautitlán Izcalli (México) México: UNAM,1982
  118. Stadlober M., Sager M., Irgolic K. J. Effects of Selenate Supplemented Fertilization in the Selenium Level of Cereals. Identification and Quantification of Selenium Compounds by HPLC-ICP-MS. *Food Chem* 2001; 73: 357-366.
  119. Steel R. G. D., Torrie J. H. Principles and Procedures of Statistics. USA: McGraw-Hill, 1960.

- 
120. Stowe H. D., Herdt T. M. Clinical Assessment of Selenium Status of Livestock. *J Anim Sci* 1992; 70: 3928 - 3933.
  121. Strouth M. K. D. Niveles de Selenio en Alfalfa y Sangre de Vacas Holstein y Correlación entre Niveles de Selenio y Glutación Peroxidasa (Tesis de Maestría) México (D.F.) México: UNAM, 1985.
  122. Suhajda A. Hegoczki J., et al. Preparation of Selenium Yeast I. Preparation of Selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *J Trace Elem Med Biol* 2000; 14 (1): 43-47.
  123. Sunde R. A. Selenium. In: *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*. USA: Marcel Dekker, 1997.
  124. Suoranta K., Sinda E. Selenium of Selenium Yeast Enters the Cow's Milk. *Norw J Agric Sci Suppl* 1993; 11: 215.
  125. Swanson C. A., Patterson B. H., et al. Human [<sup>75</sup>Se] Selenomethionine Metabolism : A Kinetic Model. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 917 - 926 .
  126. Swecker W.S., Eversole O. M., et al. Influence of Supplemental Selenium on Humoral Immune Responses in Weaned Beef Calves. *Am J Vet Res* 1989; 50 (10):1760-1763.
  127. Swecker W.S., Thatcher C. D., et al. Effect of Selenium Supplementation on Colostral IgG Concentration in Cows Grazing Selenium-Deficient Pastures and on Postsuckle Serum IgG Concentration in their Calves. *Am J Vet Res* 1995; 56(4): 450-453.
  128. Swecker W. Selenium and immune function in cattle. *Comp Cont Ed Pract Vet* 1997; 10: 248-254.
  129. Symonds H. W., Sansom B. F., et al. Selenium Metabolism in the Dairy Cow: The Influence of the Liver and the Effect of the Form of Se Salt. *Br J Nutr* 1981; 45:117-125.



- 
130. Tasker J. B. Current Options in Selenium Supplementation. Proceeding of the 22nd. Seminar Sheep and Beef Seminar Cattle Society. New Zealand Veterinary Association Incorporating the NZVA Conference. 1992; 154: 53-59.
  131. Thompson K. G., Fraser A. J. et al. Glutathione Peroxidase in Bovine Serum and Erythrocytes in Relation to Selenium Concentrations of Blood, Serum and Liver. Res Vet Sci 1980; 28: 321 - 324.
  132. Thompson K. G., Fraser A. J., et al. Glutathione Peroxidase Activity and Selenium Concentration in Bovine Blood and Liver as Indicators of Dietary Selenium Intake. N Z Vet J 1981; 29: 3 - 6.
  133. Ullrey D. E. Biochemical and Physiological Indicators of Selenium Status in Animals. J Anim Sci 1987; 65: 1712 - 1726.
  134. Ullrey D. E. Basis for Regulation of Selenium Supplements in Animal Diets. J Anim Sci 1992; 70: 3922 - 3927.
  135. Underwood, E. J. and Suttle N. F. In: The Mineral Nutrition of Livestock. 3<sup>rd</sup>-Midlothian, U. K., 1999.
  136. Valladares C. B. Efecto del Selenito de Sodio Aplicado por Vía Intramuscular y Subcutánea sobre los Niveles de Selenio, Actividad de Glutathión Peroxidasa (GSH-Px) e Inmunoglobulinas Anti IgG F5+ de *E. coli* en Corderos (Tesis de Maestría) Toluca (México) México: UAEM, 2001
  137. Waldner C., Campbell J., et al. Comparison of 3 Methods of Selenium Assessment in Cattle. Can. Vet. J. (1998) 39: 225-231.
  138. Watkinson J. H. Prevention of Selenium Deficiency of Grazing Animals by Annual Top-Dressing of Pasture With Sodium Selenate. N Z Vet J 1983; 31: 78 - 75.
  139. Watkinson J. H. Application of Selenium to Pasture. Trace Elements in Ruminants. Proceeding of the 22<sup>nd</sup>. Seminar Sheep and Beef Seminar Cattle Society. New Zealand Veterinary Association Incorporating the NZVA Conference. 1992; 154: 125-131.

140. Whanger P. D., weswig P. H., Muth O. H. Metabolism of  $^{75}\text{Se}$ -selenite and  $^{75}\text{Se}$ -selenomethionine by Rumen Microorganisms. Fed Proc 1968; 27:418 (Abstr.)
141. Whelan B. R. Selenium Fertilizers for Pastures Grazed by Sheep. I. Selenium Concentrations in Whole Blood and Plasma. Aust J Agric Res 1994; 45: 863 - 875.
142. Wichtel J. J. A review of Selenium Deficiency in Grazing Ruminants Part 1: New Roles for Selenium in Ruminant Metabolism. N Z Vet J 1998; 46: 47 - 52.
143. Wild A. Russell's Soil Condition and Plant Growth. 11<sup>th</sup>. Longman Scientific Technical, 1988
144. Wilkins J. F., Hamilton B. A. Low Release of Selenium from Recovered Ruminant Pellets. Aust Vet J 1980; 56: 87 - 89.
145. Wolfinger R., Chang M. Comparing the SAS<sup>®</sup> GLM and MIXED Procedures for Repeated Measures. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA, 1999.
146. Wyatt C. J., Meléndez J. M. Selenium in Foods in Northern Mexico; their Contribution to the Daily Selenium Intake and the Relationship of Selenium Plasma and Glutathione Peroxidase Activity. Nutr Res 1996; 16: 949-960.
147. Zhang W. R., Ku P. K., Miller E. R., Ullrey D. E. Stability of Glutathione Peroxidase in Swine Plasma Samples under various Storage Conditions. Can J Vet Res 1986; 50: 390 - 392.

## SITIOS WEB

1. Anzola H. J. (2001) Algunas Descripciones de la Actividad Biológica y Fisiológica del Selenio. 28 de mayo del 2001.  
[http://www.encolombia.com/acovez24284\\_algunas14.htm](http://www.encolombia.com/acovez24284_algunas14.htm)
2. Anzola H. J. (2001) Selenio Orgánico  
[http://www.encolombia.com/acovez2482\\_organico16.htm](http://www.encolombia.com/acovez2482_organico16.htm)
3. Blanco G. E. (1997) Estado de México. 1º de noviembre del 2003.  
<http://www.kokone.com.mx/viaja/estados/edomex.html>

- 
110. Sarkar S., Das K. C., Chowdhury S. P., Bhowmik M. K., Mukherjee B. N. Effect of Certain Micromineral Status in the Soils and Forages of Lluvian Tropics on the Incidence of Nutritional Anemia in Grazing Sheep. *Indian J Anim Sci* 1992; 62: 665 - 669.
111. Schrauzer G. N. Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. *J Nutr* 2000; 130: 1653 - 1656.
112. Serra A. B., Serra S.D. et al. Effect of Selenium in Soluble Glass Bolus on Selenium Content of Milk and Blood of Goats. *Biol Trace Elem Res* 1996; 55:207-211.
113. Serra A. B., Serra S. D., T. Fujihara. Influence of Dietary Protein on the Fractionation of Selenium in the Rumen of Sheep. *Aust J Am Stud* 1996; 9(5): 557-562.
114. Serra A. B., Serra S. D., Kousei S., Fujihara T. Bioavailability of Rumen Bacterial Selenium in Mice Using Tissue Uptake Technique. *Biol Trace Elem Res* 1997; 58:255-261.
115. Sheppard A. D., Millar K. R. Stability of Glutathione Peroxidase in Ovine Blood Samples under Various Storage Conditions and the Response of this Enzyme to Different Methods of Selenium Supplementation. *N Z Vet J*.1981; 29: 77 - 80.
116. Smith K. L., Hogan J. S., Conrad H. R. Selenium in Dairy Cattle: Its Role in Disease Resistance. *Vet Med* 1988; 83: 72 - 78

- 
117. Spross, S. A. Evaluación del Contenido Mineral en Suelo, Planta y Animal, de Cinco Ranchos del Estado de México y Estado de Hidalgo (Tesis de Maestría) Cuautitlán Izcalli (México) México: UNAM, 1982
118. Stadlober M., Sager M., Irgolic K. J. Effects of Selenate Supplemented Fertilization in the Selenium Level of Cereals. Identification and Quantification of Selenium Compounds by HPLC-ICP-MS. Food Chem 2001; 73: 357-366.
119. Steel R. G. D., Torrie J. H. Principles and Procedures of Statistics. USA: McGraw-Hill, 1960.
120. Stowe H. D., Herdt T. M. Clinical Assessment of Selenium Status of Livestock. J Anim Sci 1992; 70: 3928 - 3933.
121. Strouth M. K. D. Niveles de Selenio en Alfalfa y Sangre de Vacas Holstein y Correlación entre Niveles de Selenio y Glutación Peroxidasa (Tesis de Maestría) México (D.F.) México: UNAM, 1985.
122. Suhajda A. Hegoczki J., et al. Preparation of Selenium Yeast I. Preparation of Selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. J Trace Elem Med Biol 2000; 14 (1): 43-47.
123. Sunde R. A. Selenium. In: Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. USA: Marcel Dekker, 1997.
124. Suoranta K., Sinda E. Selenium of Selenium Yeast Enters the Cow's Milk. Norw J Agric Sci Suppl 1993; 11: 215.

- 
125. Swanson C. A., Patterson B. H., et al. Human [<sup>71</sup>Se] Selenomethionine Metabolism : A Kinetic Model. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 917 - 926 .
126. Swecker W.S., Eversole O. M., et al. Influence of Supplemental Selenium on Humoral Immune Responses in Weaned Beef Calves. *Am J Vet Res* 1989; 50 (10):1760-1763.
127. Swecker W.S., Thatcher C. D., et al. Effect of Selenium Supplementation on Colostral IgG Concentration in Cows Grazing Selenium-Deficient Pastures and on Postsuckle Serum IgG Concentration in their Calves. *Am J Vet Res* 1995; 56(4): 450-453.
128. Swecker W. Selenium and immune function in cattle. *Comp Cont Ed Pract Vet* 1997; 10: 248-254.
129. Symonds H. W., Sansom B. F., et al. Selenium Metabolism in the Dairy Cow: The Influence of the Liver and the Effect of the Form of Se Salt. *Br J Nutr* 1981; 45:117-125.
130. Tasker J. B. Current Options in Selenium Supplementation. Proceeding of the 22<sup>nd</sup>. Seminar Sheep and Beef Seminar Cattle Society. New Zealand Veterinary Association Incorporating the NZVA Conference. 1992; 154: 53-59.
131. Thompson K. G., Fraser A. J. et al. Glutathione Peroxidase in Bovine Serum and Erythrocytes in Relation to Selenium Concentrations of Blood, Serum and Liver. *Res Vet Sci* 1980; 28: 321 - 324.

**Ænexos**

## Anexo 1. Técnicas analíticas empleadas

### Anexo 1.1. Técnica para la determinación de selenio total en plasma (Gleason, 2003)

#### MATERIAL

- Pipeta automática
- Puntas para pipeta automática
- Vaso de precipitado de 50, 100 mL
- Matraces volumétricos de 25, 50, 100, 250 y 1000 mL
- Probeta graduada de 10 mL
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Papel aluminio
- Lámpara de cátodo hueco
- Frascos de plástico opalescente de 100 mL

#### REACTIVOS

- Agua desionizada
- Ácido nítrico químicamente puro
- Ácido clorhídrico concentrado grado analítico
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Estándar de selenio para absorción atómica a concentración de 1000 ppm
- Borohidruro de sodio
- Hidróxido de sodio

---

## PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Lavar cuidadosamente y enjuagar con agua desionizada todo el material de vidrio a emplear
- Preparar la solución blanco y las soluciones estándares de selenio a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 ppb a partir de una solución stock de 2000 ppb de selenio para la curva de calibración. Los sistemas se llevan a la marca de aforo con HCl 7M
- El plasma se mantuvo en congelación en viales cubiertos con papel *parafilm*. Se tomaron muestras de 1 g con pipeta automática y se depositaron en los vasos del horno de microondas MARS 5 (Microwave Accelerated Reaction System). Éstos últimos se pesaron vacíos en balanza analítica.

## PROCESO DE DIGESTIÓN

- Llevar los vasos con las muestras a la campana de extracción y adicionar a cada uno: 10 mL de agua desionizada, 5 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de peróxido al 30%
- Dejar reposar las muestras durante 30 minutos
- Tapar los vasos y colocarlos en el carrusel del horno de microondas
- Colocar el sensor de temperatura
- Programa del horno de microondas: programa HP500 PLASMA2, rampa de temperatura 1200 W al 100% 5 minutos para llegar a 120°C, mantener a esa temperatura 2 min, rampa de temperatura 1200 W al 100% 5 minutos para llegar a 170°C, 350 Psi (presión constante)
- Sacar los vasos cuando la temperatura disminuya a 90°C
- Colocar los vasos en la campana de extracción para que se enfríen
- Transferir las muestras digeridas a matraces volumétricos de 50 mL y llevar a la marca de aforo con HCl 7M



## PROCESO DE MEDICIÓN

- Se empleó la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros con los siguientes parámetros ajustados con ayuda del Software SpectrAA V.2.0:
  - o Modo de muestreo:
    - Manual
    - Longitud de onda: 196 nm
    - Flujo del aire: 13.5 L/min
    - Flujo del acetileno: 2.10 L/min
    - Flujo de la muestra: 8 mL/min
    - Flujo del reductor y el ácido: 1 mL/min
  - o Modo de medición: integración
  - o Calibración: concentración
  - o Réplicas: 3 para el estándar y 3 para la muestra
  - o Corriente de la lámpara: 10 mA

## Anexo 1.2. Técnica para la determinación de selenio total en levaduras enriquecidas (Kotrebai et al., 1999)

### MATERIAL

- Pipeta automática
- Puntas para pipeta automática
- Vaso de precipitado de 25, 50 y 100 mL
- Matraces volumétricos de 25
- Balanza analítica
- Papel *parafilm*
- Lámpara de cátodo hueco
- Frascos de plástico opalescente de 100 mL
- Espátula

### REACTIVOS

- Agua desionizada
- Ácido nítrico químicamente puro
- Ácido clorhídrico concentrado grado analítico
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Estándar de selenio para absorción atómica a concentración de 1000 ppm

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Lavar cuidadosamente y enjuagar con agua desionizada todo el material de vidrio a emplear

- 
- Transferir las muestras digeridas a matraces volumétricos de 50 mL y llevar a la marca de aforo con HCl 7M

### PROCESO DE MEDICIÓN

- Se empleó la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros con los siguientes parámetros ajustados con ayuda del Software SpectrAA V.2.0:
  - o Modo de muestreo:
    - Manual
    - Longitud de onda: 196 nm
    - Flujo del aire: 13.5 L/min
    - Flujo del acetileno: 2.10 L/min
    - Flujo de la muestra: 8 mL/min
    - Flujo del reductor y el ácido: 1 mL/min
  - o Modo de medición: integración
  - o Calibración: concentración
  - o Réplicas: 3 para el estándar y 3 para la muestra
  - o Corriente de la lámpara: 10 mA

### Anexo 1.2. Técnica para la determinación de selenio total en levaduras enriquecidas (Kotrebai et al., 1999)

#### MATERIAL

- Pipeta automática
- Puntas para pipeta automática
- Vaso de precipitado de 25, 50 y 100 mL
- Matraces volumétricos de 25

## PROCESO DE MEDICIÓN

- Se empleó la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Emisión de Flama con los siguientes parámetros ajustados con ayuda del Software SpectrAA V.2.0:
  - o Modo de muestreo:
    - Manual
    - Longitud de onda: 196 nm
    - Flujo del oxido nitroso: 11 /min
    - Flujo del acetileno: 6.63 L/min
  - o Modo de medición: integración
  - o Calibración: concentración
  - o Réplicas: 3 para el estándar y 3 para la muestra
  - o Corriente de la lámpara: 10 mA

### **Anexo 1.3. Técnica para la determinación de selenio total en forraje (alfalfa)**

#### **MATERIAL**

- Pipeta automática
- Puntas para pipeta automática
- Vaso de precipitado de 25, 50 y 100 mL
- Matraces volumétricos de 25
- Balanza analítica
- Lámpara de cátodo hueco
- Frascos de plástico opalescente de 100 mL
- Espátula

#### **REACTIVOS**

- Agua desionizada
- Ácido nítrico químicamente puro
- Ácido clorhídrico concentrado grado analítico
- Estándar de selenio para absorción atómica a concentración de 1000 ppm

#### **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

- Lavar cuidadosamente y enjuagar con agua desionizada todo el material de vidrio a emplear

## PROCESO DE MEDICIÓN

- Se empleó la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Emisión de Flama con los siguientes parámetros ajustados con ayuda del Software SpectrAA V.2.0:
  - o Modo de muestreo:
    - Manual
    - Longitud de onda: 196 nm
    - Flujo del oxido nitroso: 11 /min
    - Flujo del acetileno: 6.63 L/min
  - o Modo de medición: integración
  - o Calibración: concentración
  - o Réplicas: 3 para el estándar y 3 para la muestra
  - o Corriente de la lámpara: 10 mA

## Anexo 1.3. Técnica para la determinación de selenio total en forraje (alfalfa)

### MATERIAL

- Pipeta automática
- Puntas para pipeta automática
- Vaso de precipitado de 25, 50 y 100 mL
- Matraces volumétricos de 25

## PROCESO DE MEDICIÓN

- Se empleó la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generador de Hidruros con los siguientes parámetros ajustados con ayuda del Software SpectrAA V.2.0:
  - o Modo de muestreo:
    - Manual
    - Longitud de onda: 196 nm
    - Flujo del oxido nitroso: 11 /min
    - Flujo del acetileno: 6.63 L/min
  - o Modo de medición: integración
  - o Calibración: concentración
  - o Réplicas: 3 para el estándar y 3 para la muestra
  - o Corriente de la lámpara: 10 mA

---

#### Anexo 1.4. Técnica para la determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) en plasma (modificación a la técnica de Paglia y Valentine, 1967)

##### MATERIAL

- Pipeta automática
- Puntas para pipeta automática
- Pipeta graduada de 5 mL
- Pipeta volumétrica de 2, 20 y 25 mL
- Vasos de precipitado de 25, 50, 100, 150 mL
- Matraces volumétricos de 200 y 250 mL
- Agitador de vidrio
- Balanza analítica
- Papel *parafilm*
- Espátula
- Cronómetro
- Bolsas con gel congelante
- Celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico de 1.4 y 3.0 mL de capacidad

##### REACTIVOS

- Agua desionizada
- Hidróxido de sodio 2N
- Ácido clorhídrico 2N
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Buffer de fosfatos pH 7.0



- Glutati3n reducido
- Glutati3n reductasa
- NADPH
- Fosfato monob3sico de potasio
- Fosfato dib3sico de potasio
- EDTA
- Azida de sodio

#### PREPARACI3N DE LAS MUESTRAS

- Lavar cuidadosamente y enjuagar con agua desionizada el material de vidrio a emplear.
- Descongele las muestras (de preferencia, deje las muestras en el refrigerador durante toda la noche)
- Realizar 50 ensayos por d3a (25 muestras con su respectivo blanco)
- Prepare el buffer de fosfatos de acuerdo a la siguiente tabla:

REACTIVO	F3RMULA	500 mL	250 mL
Fosfato de potasio monob3sico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.7125 g	1.3562 g
Fosfato de potasio dib3sico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7.4188 g	3.7094 g
EDTA 5.5 mM	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.8150 g	0.4075 g
Azida de sodio 4.7 mM	$\text{NaN}_3$	0.1525 g	0.0762 g

- Prepare una soluci3n de per3xido el mismo d3a que ser3 utilizada con 33  $\mu\text{L}$  de per3xido de hidr3geno al 30% en 200 mL de agua desionizada.

- Prepare la mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla y manténgala en hielo hasta el momento de usarla para minimizar la conversión de NADPH a NADP.

REACTIVO	CAT. SIGMA #	PARA 10 ENSAYOS	PARA 50 ENSAYOS
NADPH	N-6505	2.33 mg	11.65 mg
Glutación reducido	G470-5	15.33 mg	76.65 mg
Glutación reductasa	G366-4	6.7 unidades*	25.0 $\mu$ L**
Buffer de Fosfatos		8.0 mL	40 mL

\* Cálculo:  $[6.7 / (\text{unidades por mg proteína})] / (\text{mg proteína por mL}) = \text{mL G-4751 necesarios}$

\*\* Para un frasco de enzima con 198 unidades por mg de proteína y 6.8 mg de proteína por mL se requieren 5  $\mu$ L por cada 10 ensayos.

- Preparación del blanco y la muestra:
  - o Blanco:
    - Coloque 100  $\mu$ L del buffer de fosfatos en la celda de cuarzo
    - Adicione 800  $\mu$ L de la mezcla de reacción y permita que alcancen la temperatura ambiente durante 8 minutos
  - o Muestra:
    - Coloque 50  $\mu$ L del buffer de fosfatos en la celda de cuarzo
    - Adicione 50  $\mu$ L de la muestra
    - Adicione 800  $\mu$ L de la mezcla de reacción y permita que alcancen la temperatura ambiente durante 8 minutos

- 
- o Después de 8 minutos, adicione 100  $\mu$ L de la dilución de peróxido al blanco y a la muestra. Tape la celda con papel *parafilm* y agite vigorosamente. Inmediatamente después, colóquela en el espectrofotómetro. En este momento se inicia la corrida (la duración de la corrida es de 5 minutos).

### PROCESO DE MEDICIÓN

- Se empleó la técnica de Espectrofotometría UV/VIS
- Las lecturas se efectuaron con ayuda del Software Cary WinUV, Módulo: Concentration a una longitud de onda de 340 nm
- Colocar 2.5 mL de buffer de fosfatos en las celdas de cuarzo de 3.0 mL para ajustar el equipo a cero.
- Una vez ajustado el cero, quitar una de las celdas del espectrofotómetro y colocar la celda de 1 mL con el blanco.
- Tomar la lectura del blanco 15 segundos después de haber adicionado el sustrato (ya que las velocidades pueden no ser representativas de la actividad de la enzima debido al mezclado de la muestra) y a los 5 minutos después de iniciada la corrida.
- Retirar el blanco y colocar la celda con la muestra.
- Tomar la lectura de la muestra de igual manera que para el blanco.
- El número de nmoles de NADPH oxidadas por minuto por mL de muestra se calcula mediante las siguientes fórmulas:

a) Muestra:

$$\frac{\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Tiempo total}} = \frac{\Delta A_m}{\text{min}}$$

b) Blanco:

$$\frac{\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Tiempo total}} = \frac{\Delta A_b}{\text{min}}$$

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

donde:

Abs<sub>inicial</sub> = Absorbancia inicial a 340 nmAbs<sub>final</sub> = Absorbancia final (después de 5 minutos) a 340 nm

1607.7 = Coeficiente de extinción de NADPH

**Anexo 2. Características farmacotécnicas de algunos bolos con Levinact®**

<b>NO. BOLO</b>	<b>LARGO (mm)</b>	<b>ANCHO (mm)</b>	<b>ESPEJOR (mm)</b>	<b>MASA (g)</b>
1	64.42	19.70	15.71	33.19
2	64.38	19.70	15.66	33.13
3	64.39	19.69	15.80	33.11
4	64.40	19.69	15.72	33.15
5	64.40	19.71	15.64	33.10
6	64.40	19.70	15.67	33.15
7	64.40	19.70	15.66	33.17
8	64.40	19.70	15.79	33.12
9	64.43	19.71	15.59	33.13
10	64.42	19.71	15.55	33.12
11	64.40	19.67	15.56	33.13
12	64.42	19.70	15.56	33.16
<b>PROMEDIO:</b>	64.41	19.70	15.66	33.14

## Anexo 3. Distribución de los animales empleados en el estudio exploratorio

CORRAL	VACA	NO. BOLO	GRUPO	PRODUCCIÓN (DIAS)
1	T50	1	Tratado	193
	A23	-	Testigo	179
	S174	7	Tratado	175
	A31	-	Testigo	138
	U26	11	Tratado	124
	R90	-	Testigo	150
2	P127	16	Tratado	200
	R43	-	Testigo	182
	R156	20	Tratado	168
	T142	-	Testigo	168
	S12	-	Testigo	161
	T12	3	Tratado	161
3	U1	-	Testigo	125
	T90	8	Tratado	181
	A22	-	Testigo	166
	P31	12	Tratado	161
	Q23	19	Tratado	150
5	A19	-	Testigo	196
	A9	22	Tratado	191
	A28	-	Testigo	-

Anexo 4. Características farmacotécnicas de algunos bolos con Sel-Plex™

0+. NO. BOLO	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ESPEJOR (mm)	MASA (g)
1	64.50	19.71	17.96	33.20
2	64.51	19.73	18.23	33.21
3	64.46	19.93	17.92	33.20
4	64.50	19.75	18.26	33.20
5	64.54	19.75	18.05	33.20
6	64.52	19.75	18.10	33.19
7	64.44	19.75	18.42	33.19
8	64.50	19.78	18.21	33.22
9	64.51	19.76	17.97	33.17
10	64.52	19.81	18.02	33.20
11	64.47	19.74	18.16	33.23
12	64.47	19.77	18.28	33.20
13	64.46	19.71	18.28	33.21
14	64.48	19.73	18.26	33.21
15	64.42	19.80	18.12	33.20
<b>PROMEDIO:</b>	64.50	19.76	18.15	33.20

---

**Anexo 5. Características farmacotécnicas de algunos bolos con Selenito de Sodio**

<b>NO. BOLO</b>	<b>LARGO (mm)</b>	<b>ANCHO (mm)</b>	<b>ESPESOR (mm)</b>	<b>MASA (g)</b>
1	45.02	13.15	21.21	33.18
2	45.01	13.14	21.39	33.19
3	45.04	13.18	21.38	33.19
4	44.96	13.18	21.49	33.19
5	44.98	13.16	21.17	33.19
6	45.02	13.15	21.32	33.18
7	44.97	13.16	21.30	33.18
8	45.06	13.16	21.26	33.17
9	45.02	13.15	21.25	33.16
10	45.02	13.15	21.41	33.18
11	45.01	13.17	21.42	33.16
12	45.01	13.15	21.17	33.16
13	45.00	13.13	21.30	33.18
14	45.01	13.16	21.37	33.18
15	44.97	13.17	21.19	33.18
<b>PROMEDIO:</b>	45.00	13.14	21.31	33.18



## Anexo 6. Distribución de los animales empleados en el estudio comparativo

VACA	NÚMERO BOLO	GRUPO	NÚMERO PARTOS	FECHA SECADO	FECHA PARTO
812	-	Testigo	5	15-Mayo-2003	17-Jul
1339	-	Testigo	1	15-Mayo-2003	15-Jul
1275	-	Testigo	2	29-Mayo-03	18-Jul
1112	-	Testigo	3	29-Mayo-03	1°-Ago
944	-	Testigo	5	12-Junio-2003	06-Sep
1223	-	Testigo	3	19-Junio-2003	10-Sep
1408	-	Testigo	1	03-Julio-2003	19-Oct
1262	-	Testigo	2	10-Julio-2003	05-Sep
1320	-	Testigo	1	10-Julio-2003	12-Sep
1236	-	Testigo	1	10-Julio-2003	26-Sep
1202	5	Sel-Plex	2	15-Mayo-2003	16-Ago
1205	4	Sel-Plex	2	15-Mayo-2003	13-Jul
1217	2	Sel-Plex	2	29-Mayo-03	06-Ago
1017	3	Sel-Plex	4	29-Mayo-03	13-Ago
899	14	Sel-Plex	4	12-Junio-2003	22-Ago
1135	13	Sel-Plex	3	03-Julio-2003	28-Sep
1107	11	Sel-Plex	-	03-Julio-2003	27-Oct
860	15	Sel-Plex	5	12-Junio-2003	18-Sep
1342	8	Sel-Plex	1	10-Julio-2003	16-Sep
1051	16	Sel-Plex	4	10-Julio-2003	14-Sep
906	17	Sel-Plex	5	10-Julio-2003	13-Sep
1328	1	Selenito	1	15-Mayo-2003	27-Junio
1279	3	Selenito	1	29-Mayo-03	13-Ago
1222	5	Selenito	2	29-Mayo-03	03-Jul
1189	15	Selenito	3	12-Junio-2003	16-Ago
1244	2	Selenito	2	10-Julio-2003	16-Sep
1078	13	Selenito	3	03-Julio-2003	28-Sep
76	12	Selenito	4	03-Julio-2003	12-Oct
1058	4	Selenito	4	10-Julio-2003	Murió
1324	6	Selenito	1	10-Julio-2003	04-Oct
1173	7	Selenito	3	10-Julio-2003	30-Sep

## Anexo 7. Resultados del análisis estadístico para los perfiles plasmáticos de selenio de los animales del estudio exploratorio

### The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.SELENI0
Dependent Variable	SELENI0
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	ANIMAL(TRATAM)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

### Class Level Information

Class	Levels	Values
ANIMAL	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
TRATAM	2	1 2
TIEMPO	5	7 14 21 28 35

### Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	19
Columns in Z	0
Subjects	17
Max Obs Per Subject	5
Observations Used	80
Observations Not Used	20
Total observations	100

Convergence criteria met.

Estimated R Matrix for ANIMAL(TRATAM) 1 1					
Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	1771.63	837.53	837.53	837.53	837.53
2	837.53	1771.63	837.53	837.53	837.53
3	837.53	837.53	1771.63	837.53	837.53
4	837.53	837.53	837.53	1771.63	837.53
5	837.53	837.53	837.53	837.53	1771.63

Estimated R Correlation Matrix for ANIMAL(TRATAM) 1 1					
Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	1.0000	0.4727	0.4727	0.4727	0.4727
2	0.4727	1.0000	0.4727	0.4727	0.4727
3	0.4727	0.4727	1.0000	0.4727	0.4727
4	0.4727	0.4727	0.4727	1.0000	0.4727
5	0.4727	0.4727	0.4727	0.4727	1.0000

### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS	ANIMAL(TRATAM)	837.53
Residual		934.10

## Fit Statistics

Res Log Likelihood	-361.7
Akaike's Information Criterion	-363.7
Schwarz's Bayesian Criterion	-364.5
-2 Res Log Likelihood	723.4

## Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
1	19.90	<.0001

## Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TRATAM	1	14	4.89	0.0441*
TIEMPO	4	55	0.47	0.7599
TRATAM*TIEMPO	4	55	0.67	0.6187
INICIAL	1	14	1.52	0.2378

## Least Squares Means

Effect	TRATAM	TIEMPO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TRATAM	1		128.17	10.1804	14	12.59	<.0001
TRATAM	2		163.47	12.2629	14	13.33	<.0001
TIEMPO		7	145.15	10.3805	55	13.98	<.0001
TIEMPO		14	150.07	10.7054	55	14.02	<.0001
TIEMPO		21	150.41	10.6913	55	14.07	<.0001
TIEMPO		28	136.96	10.6892	55	12.81	<.0001
TIEMPO		35	146.53	10.7079	55	13.68	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	7	124.40	13.3121	55	9.35	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	14	129.05	14.3331	55	9.00	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	21	125.80	13.3121	55	9.45	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	28	123.95	13.3121	55	9.31	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	35	137.66	13.3121	55	10.34	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	7	165.89	15.9465	55	10.40	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	14	171.08	15.9465	55	10.73	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	21	175.03	16.7439	55	10.45	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	28	149.97	16.7357	55	8.96	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	35	155.40	16.7962	55	9.25	<.0001

## Differences of Least Squares Means

Effect	TRATAM	TIEMPO	_TRATAM	_TIEMPO	Standard Estimate Error	DF	t Value	Pr >  t	
TRATAM	1		2		-35.3001	15.9571	14	-2.21	0.0441

## Anexo 8. Resultados del análisis estadístico para la actividad de la GSH-Px en plasma de los animales del estudio exploratorio

### The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.GSH
Dependent Variable	GSH
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	ANIMAL(TRATAM)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

### Class Level Information

Class	Levels	Values
ANIMAL	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
TRATAM	2	1 (TESTIGO) 2 (TRATADAS)
TIEMPO	5	7 14 21 28 35

### Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	19
Columns in Z	0
Subjects	19
Max Obs Per Subject	5
Observations Used	86
Observations Not Used	14
Total Observations	100

Convergence criteria met.

### Estimated R Matrix for ANIMAL(TRATAM) 1 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	19610	2461.18	2461.18	2461.18	2461.18
2	2461.18	19610	2461.18	2461.18	2461.18
3	2461.18	2461.18	19610	2461.18	2461.18
4	2461.18	2461.18	2461.18	19610	2461.18
5	2461.18	2461.18	2461.18	2461.18	19610

### Estimated R Correlation Matrix for ANIMAL(TRATAM) 1 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	1.0000	0.1255	0.1255	0.1255	0.1255
2	0.1255	1.0000	0.1255	0.1255	0.1255
3	0.1255	0.1255	1.0000	0.1255	0.1255
4	0.1255	0.1255	0.1255	1.0000	0.1255
5	0.1255	0.1255	0.1255	0.1255	1.0000

### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS	ANIMAL(TRATAM)	2461.18
Residual		17149

Fit Statistics

Res Log Likelihood	-494.3
Akaike's Information Criterion	-496.3
Schwarz's Bayesian Criterion	-497.3
-2 Res Log Likelihood	988.7

Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
1	1.79	0.1806

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TRATAM	1	16	3.10	0.0976
TIEMPO	4	59	4.59	0.0027*
TRATAM*TIEMPO	4	59	2.03	0.1018
INICIAL	1	16	8.38	0.0105*

Contrasts

Label	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
LINEAR TREND	1	59	0.46	0.5008
QUADRATIC TREND	1	59	2.82	0.0986
CUBIC TREND	1	59	4.52	0.0377*

Least Squares Means

Effect	TRATAM	TIEMPO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TRATAM	TESTIGO		620.36	26.9198	16	23.04	<.0001
TRATAM	TRATADAS		552.56	26.3662	16	20.96	<.0001
TIEMPO		7	563.96	32.1736	59	17.53	<.0001
TIEMPO		14	591.07	32.1736	59	18.37	<.0001
TIEMPO		21	703.19	39.6106	59	17.75	<.0001
TIEMPO		28	495.44	32.9708	59	15.03	<.0001
TIEMPO		35	578.64	33.9478	59	17.04	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TESTIGO	7	568.75	44.7183	59	12.72	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TESTIGO	14	626.62	44.7183	59	14.01	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TESTIGO	21	813.10	62.2415	59	13.06	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TESTIGO	28	538.04	46.9427	59	11.46	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TESTIGO	35	555.31	49.5892	59	11.20	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TRATADAS	7	559.17	46.9917	59	11.90	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TRATADAS	14	555.52	46.9917	59	11.82	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TRATADAS	21	593.29	49.7275	59	11.93	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TRATADAS	28	452.84	46.9917	59	9.64	<.0001
TRATAM*TIEMPO	TRATADAS	35	601.97	46.9917	59	12.81	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	TRATAM	TIEMPO	TRATAM TRATADO	TIEMPO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TRATAM	TESTIGO				67.8061	38.5378	16	1.76	0.0976

## Anexo 9. Resultados del análisis de correlación para la concentración de selenio y la actividad de la GSH-Px en plasma de los animales del estudio exploratorio

### The CORR Procedure

2 Variables: SELENIO GSH\_PX

### Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
SELENIO	52	149.57231	51.62875	7778	49.58000	257.21000	SELENIO
GSH	57	589.85070	187.51784	33621	292.60000	49.58000	GSH

### Pearson Correlation Coefficients

Prob > |r| under H0: Rho=0  
Number of observations

	GSH	SELENIO
GSH	1.00000	0.16955
	52	49
SELENIO	0.16955	1.00000
	0.2442	57
	49	

## Anexo 10. Resultados del análisis estadístico para el contenido de selenio total en las levaduras enriquecidas

### Alltech México

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	FESC	ALLTECH MEXICO
Media	1277.731175	1000.25
Varianza	1697.74076	9.016667
Observaciones	4	4
Grados de libertad	3	3
F	188.2891786	
P(F<=f) una cola	0.000650835	
valor crítico para F (una cola)	9.276618584	
<p>F calculada &gt; F crítica (188.29 &gt; 9.28)  Las varianzas son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.</p>		

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	FESC	ALLTECH MEXICO
Media	1277.731175	1000.25
Varianza	1697.74076	9.016667
Observaciones	4	4
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	13.43314242	
P(T<=t) una cola	0.000445975	
valor crítico de t (una cola)	2.353363016	
P(T<=t) dos colas	0.000891951	
valor crítico de t (dos colas)	3.182449291	
<p>t calculada &gt; t crítica (13.43 &gt; 2.35)  Las medias son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.</p>		

## BioTecApSa de C.V.

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	FESC	BIOTECAPSA
Media	1992.489782	2000.1
Varianza	5660.077783	21.766667
Observaciones	4	4
Grados de libertad	3	3
F	260.0342013	
P(F<=f) una cola	0.000402071	
valor crítico para F (una cola)	9.276618584	
F calculada > F crítica (260.03 > 9.28) Las varianzas son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.		

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	FESC	BIOTECAPSA
Media	1992.489782	2000.1
Varianza	5660.077783	21.766667
Observaciones	4	4
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-0.20192143	
P(T<=t) una cola	0.426447577	
valor crítico de t (una cola)	2.353363016	
P(T<=t) dos colas	0.852895153	
valor crítico de t (dos colas)	3.182449291	
t calculada < t crítica (-0.20 < 2.35) Las medias son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95%		



## Anexo 11. Resultados del análisis estadístico para los perfiles plasmáticos de selenio de los animales del estudio comparativo

### The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.SELENI0
Dependent Variable	SELENI0
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	ANIMAL(TRATAM)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information	
Class	Levels
ANIMAL	28
	76 812 860 899 906 944 1017
	1051 1058 1078 1107 1112 1135
	1173 1189 1205 1217 1222 1223
	1236 1262 1275 1279 1320 1324
	1339 1342 1408
TRATAM	3
	1 2 3
TIEMPO	8
	7 14 21 28 35 42 49 56
PARTOS	5
	1 2 3 4 5

Dimensions	
Covariance Parameters	2
Columns in X	42
Columns in Z	0
Subjects	28
Max Obs Per Subject	8
Observations Used	214
Observations Not Used	26
Total observations	240

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	1833.55246779	
1	2	1832.38585394	0.00000000

Convergence criteria met.

Estimated R Matrix for ANIMAL(TRATAM) 812 1								
Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8
1	781.59	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391
2	40.2391	781.59	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391
3	40.2391	40.2391	781.59	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391
4	40.2391	40.2391	40.2391	781.59	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391
5	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	781.59	40.2391	40.2391	40.2391
6	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	781.59	40.2391	40.2391
7	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	781.59	40.2391
8	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	40.2391	781.59

Estimated R Correlation Matrix for ANIMAL(TRATAM) 812 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8
1	1.0000	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148
2	0.05148	1.0000	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148
3	0.05148	0.05148	1.0000	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148
4	0.05148	0.05148	0.05148	1.0000	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148
5	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	1.0000	0.05148	0.05148	0.05148
6	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	1.0000	0.05148	0.05148
7	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	1.0000	0.05148
8	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	0.05148	1.0000

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS	ANIMAL(TRATAM)	40.2391
Residual		741.36

Fit Statistics

Res Log Likelihood	-916.2
Akaike's Information Criterion	-918.2
Schwarz's Bayesian Criterion	-919.5
-2 Res Log Likelihood	1832.4

Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
1	1.17	0.2801

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TRATAM	2	20	3.61	0.0457*
TIEMPO	7	165	2.44	0.0210*
TRATAM*TIEMPO	14	165	1.13	0.3337
INICIAL	1	20	8.75	0.0078*
PARTOS	4	20	1.28	0.3095

Contrasts

Label	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
testigo vs selenio	1	20	0.07	0.7917
organico vs inorganico	1	20	7.01	0.0155*
LINEAR TREND	1	165	4.44	0.0366*
QUADRATIC TREND	1	165	1.16	0.2839
CUBIC TREND	1	165	3.47	0.0643
CUARTO GRADO	1	165	0.03	0.8546
QUINTO GRADO	1	165	4.79	0.0301*

Least Squares Means							
Effect	TRATAM	TIEMPO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TRATAM	1		83.7590	3.9720	20	21.09	<.0001
TRATAM	2		76.9130	4.6783	20	16.44	<.0001
TRATAM	3		93.3174	3.8273	20	24.38	<.0001
TIEMPO		7	93.6381	5.3362	165	17.55	<.0001
TIEMPO		14	80.2267	5.4201	165	14.80	<.0001
TIEMPO		21	87.4931	5.4866	165	15.95	<.0001
TIEMPO		28	93.8468	5.3362	165	17.59	<.0001
TIEMPO		35	76.7794	5.4774	165	14.02	<.0001
TIEMPO		42	89.2325	5.4845	165	16.27	<.0001
TIEMPO		49	86.7534	5.6670	165	15.31	<.0001
TIEMPO		56	69.3352	6.0095	165	11.54	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	7	96.9925	8.9701	165	10.81	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	14	76.0635	8.9701	165	8.48	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	21	97.0535	8.9701	165	10.82	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	28	89.6275	8.9701	165	9.99	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	35	83.0675	8.9701	165	9.26	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	42	83.0805	8.9701	165	9.26	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	49	85.1175	8.9701	165	9.49	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	56	59.0692	9.4634	165	6.24	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	7	85.9132	10.0189	165	8.58	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	14	84.1344	10.0189	165	8.40	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	21	68.2722	10.7025	165	6.38	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	28	79.5382	10.0189	165	7.94	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	35	55.9520	10.7096	165	5.22	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	42	77.8944	10.7501	165	7.25	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	49	89.3802	11.6074	165	7.70	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	56	74.2197	12.6356	165	5.87	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	7	98.0086	8.9049	165	11.01	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	14	80.4823	9.4185	165	8.55	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	21	97.1536	8.9049	165	10.91	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	28	112.37	8.9049	165	12.62	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	35	91.3186	8.9049	165	10.25	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	42	106.72	8.9049	165	11.98	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	49	85.7626	8.9049	165	9.63	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	56	74.7166	8.9049	165	8.39	<.0001

Differences of Least Squares Means									
Effect	TRATAM	TIEMPO	_TRATAM	_TIEMPO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TRATAM	1		2		6.8459	6.1359	20	1.12	0.2778
TRATAM	1		3		-9.5585	5.7376	20	-1.67	0.1113
TRATAM	2		3		-16.4044	6.1969	20	-2.65	0.0155*

## Anexo 12. Resultados del análisis estadístico para la actividad de la GSH-Px en plasma de los animales del estudio comparativo

### The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.GSH
Dependent Variable	GSH
Covariance Structure	Autoregressive
Subject Effect	ANIMAL(TRATAM)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-within

Class Level Information

Class	Levels	Values
ANIMAL	29	76 812 860 899 906 944 1051 1058 1078 1107 1112 1135 1173 1189 1205 1217 1222 1223 1236 1244 1262 1275 1279 1320 1324 1328 1339 1342 1408
TRATAM	3	1 2 3
TIEMPO	8	7 14 21 28 35 42 49 56
PARTOS	5	1 2 3 4 5

Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	42
Columns in Z	0
Subjects	29
Max Obs Per Subject	8
Observations Used	226
Observations Not Used	14
Total Observations	240

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	2502.19136924	
1	2	2496.30703724	0.00000000

Convergence criteria met.

Estimated R Matrix for ANIMAL(TRATAM) 812 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8
1	12818	2376.57	440.64	81.6981	15.1476	2.8085	0.5207	0.09655
2	2376.57	12818	2376.57	440.64	81.6981	15.1476	2.8085	0.5207
3	440.64	2376.57	12818	2376.57	440.64	81.6981	15.1476	2.8085
4	81.6981	440.64	2376.57	12818	2376.57	440.64	81.6981	15.1476
5	15.1476	81.6981	440.64	2376.57	12818	2376.57	440.64	81.6981
6	2.8085	15.1476	81.6981	440.64	2376.57	12818	2376.57	440.64
7	0.5207	2.8085	15.1476	81.6981	440.64	2376.57	12818	2376.57
8	0.09655	0.5207	2.8085	15.1476	81.6981	440.64	2376.57	12818

Estimated R Correlation Matrix for ANIMAL(TRATAM) 812 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8
1	1.0000	0.1854	0.03438	0.006374	0.001182	0.000219	0.000041	7.532E-6
2	0.1854	1.0000	0.1854	0.03438	0.006374	0.001182	0.000219	0.000041
3	0.03438	0.1854	1.0000	0.1854	0.03438	0.006374	0.001182	0.000219
4	0.006374	0.03438	0.1854	1.0000	0.1854	0.03438	0.006374	0.001182
5	0.001182	0.006374	0.03438	0.1854	1.0000	0.1854	0.03438	0.006374
6	0.000219	0.001182	0.006374	0.03438	0.1854	1.0000	0.1854	0.03438
7	0.000041	0.000219	0.001182	0.006374	0.03438	0.1854	1.0000	0.1854
8	7.532E-6	0.000041	0.000219	0.001182	0.006374	0.03438	0.1854	1.0000

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
AR(1)	ANIMAL(TRATAM)	0.1854
Residual		12818

Fit Statistics

Res Log Likelihood	-1248.2
Akaike's Information Criterion	-1250.2
Schwarz's Bayesian Criterion	-1251.5
-2 Res Log Likelihood	2496.3

Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
1	5.88	0.0153

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TRATAM	2	21	1.99	0.1616
TIEMPO	7	176	2.83	0.0081*
TRATAM*TIEMPO	14	176	1.00	0.4577
INICIAL	1	21	3.37	0.0806
PARTOS	4	21	2.24	0.0996

Contrasts

Label	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
testigo vs selenio	1	21	2.56	0.1246
organico vs inorganico	1	21	1.61	0.2188
LINEAR TREND	1	176	2.52	0.1145
QUADRATIC TREND	1	176	0.48	0.4916
CUBIC TREND	1	176	0.87	0.3511
CUARTO GRADO	1	176	10.00	0.0018*
QUINTO GRADO	1	176	1.66	0.1988

Least Squares Means

Effect	TRATAM	TIEMPO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TRATAM	1		724.94	16.3694	21	44.29	<.0001
TRATAM	2		773.15	17.4483	21	44.31	<.0001
TRATAM	3		741.97	16.1734	21	45.88	<.0001
TIEMPO		7	686.75	21.2234	176	32.36	<.0001
TIEMPO		14	785.22	21.2234	176	37.00	<.0001
TIEMPO		21	741.29	21.2234	176	34.93	<.0001
TIEMPO		28	736.78	21.2234	176	34.72	<.0001
TIEMPO		35	719.51	21.2234	176	33.90	<.0001
TIEMPO		42	779.07	21.5795	176	36.10	<.0001
TIEMPO		49	771.14	21.9613	176	35.11	<.0001
TIEMPO		56	753.73	22.3337	176	33.75	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	7	701.30	36.3975	176	19.27	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	14	802.78	36.3975	176	22.06	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	21	703.17	36.3975	176	19.32	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	28	718.67	36.3975	176	19.74	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	35	709.47	36.3975	176	19.49	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	42	696.67	36.3975	176	19.14	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	49	756.61	36.3975	176	20.79	<.0001
TRATAM*TIEMPO	1	56	710.88	38.3595	176	18.53	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	7	684.81	36.8484	176	18.58	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	14	767.77	36.8484	176	20.84	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	21	765.52	36.8484	176	20.77	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	28	746.42	36.8484	176	20.26	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	35	720.82	36.8484	176	19.56	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	42	871.30	38.8528	176	22.43	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	49	821.92	40.5439	176	20.27	<.0001
TRATAM*TIEMPO	2	56	806.64	40.6609	176	19.84	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	7	674.15	37.9363	176	17.77	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	14	785.11	37.9363	176	20.70	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	21	755.17	37.9363	176	19.91	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	28	745.26	37.9363	176	19.65	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	35	728.24	37.9363	176	19.20	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	42	769.25	37.9363	176	20.28	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	49	734.88	37.9363	176	19.37	<.0001
TRATAM*TIEMPO	3	56	743.67	37.9363	176	19.60	<.0001

### Anexo 13. Resultados del análisis de correlación para la concentración de selenio y la actividad de la GSH-Px en plasma de los animales del estudio exploratorio

----- TRATAMIENTO=SELENITO-----

The CORR Procedure

2 Variables: SELENIO GSH

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
SELENIO	78	82.18996	25.96266	6411	30.60633	155.87700	SELENIO
GSH	85	750.32696	126.18879	63778	326.68464	1031	GSH

Pearson Correlation Coefficients  
Prob > |r| under H0: Rho=0  
Number of Observations

	SELENIO	GSH
SELENIO	1.00000	0.01402
SELENIO		0.9036
	78	77
GSH	0.01402	1.00000
GSH	0.9036	

----- TRATAMIENTO=SEL-PLEX-----

The CORR Procedure

2 Variables: SELENIO GSH

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
SELENIO	89	92.87064	32.14140	8265	44.27174	190.50558	SELENIO
GSH	89	745.75048	110.51645	66372	468.81000	1110	GSH

Pearson Correlation Coefficients  
Prob > |r| under H0: Rho=0  
Number of Observations

	SELENIO	GSH	
SELENIO	1.00000	-0.07583	
SELENIO		0.4825	
	89	88	
GSH	-0.07583	1.00000	
GSH	0.4825		
		88	
			89