

11674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

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

**Comparación de la forma orgánica e inorgánica  
de suplementación de selenio sobre la toxicidad  
en ovinos**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**JUAN CARLOS VALADEZ PÉREZ**

**TUTOR:  
RAQUEL LÓPEZ ARELIANO**

**COMITÉ TUTORAL:  
RENE ROSILES MARTÍNEZ  
MAXIMINO HUERTA BRAVO**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

(2005)

m345168



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*A mis padres:*

*Ignacio Valadez González y Virginia Pérez Díaz*

*A mis hermanos y hermanas:*

*Luis, Roberto, Jorge, Javier, Fernando, Patricia y Claudia*

*A toda mi familia y amigos.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional, y por permitirme convivir en un ambiente académico multidisciplinario tan enriquecedor.*

*Mi agradecimiento a mis tutores, por brindarme su tiempo, sus conocimientos, pero sobre todo, su amistad.*

*Agradezco a los miembros de mi jurado por las correcciones y sugerencias tan oportunas que realizaron al presente trabajo.*

*Griselda, Enrique y Rocio: Ustedes contribuyeron a que el tiempo de estudio y trabajo dedicado a este proyecto fuera más interesante, ameno y divertido. Muchas gracias.*

*Mi reconocimiento al apoyo recibido por parte del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la FES-C; en especial al MVZ Jesús Guevara Vivero, al Ing. Miguel Ángel Farias y al MVZ Alan Olazábal Fenocho.*

*Agradezco al CONACyT por todo el apoyo recibido.*

## RESUMEN

Los ovinos son especialmente susceptibles a la deficiencia y toxicidad del selenio. Los bolos intraruminales de liberación lenta son una forma de proporcionar selenio al ganado, con la posibilidad de reducir el riesgo de provocar selenosis iatrogénica. Es necesario conocer que forma química de selenio ofrece mayores ventajas para proporcionar dosis adecuadas de selenio con menores riesgos de toxicidad. En el presente estudio se realizó la comparación de selenito de sodio y selenolevaduras, empleando 18 borregos criollos, los cuales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos. El primer grupo no recibió tratamiento, al segundo recibió el equivalente a 0.1 mg/Kg PV de selenio (vía subcutánea), el tercer grupo recibió 4 bolos de selenolevaduras (33.32 mg de selenio) y 0.1 mg/Kg PV de selenio (vía subcutánea), al cuarto grupo se le suministraron 4 bolos de selenio inorgánico (33.32 mg de selenio) y 0.1 mg/Kg PV de selenio (vía subcutánea). Se tomaron muestras semanales de plasma a todos los grupos durante un periodo de 14 semanas y se les determinó la concentración de selenio plasmático, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y la concentración de proteínas totales. Los resultados fueron analizados a través de contrastes ortogonales y se analizó la correlación entre las respuestas medidas. Se observó que existieron diferencias en la concentración plasmática de selenio entre los grupos tratados y no tratados con bolos de liberación lenta ( $P < 0.05$ ). Las medias más altas se observaron en el grupo tratado con selenolevaduras ( $P < 0.05$ ) entre las semanas 1 a 5. No se observó una correlación significativa entre las variables medidas ( $P > 0.05$ ). Ninguna de las concentraciones obtenidas se acercó a valores de toxicidad, por lo que los dos tipos de bolos resultaron seguros a las dosis empleadas.

**Palabras clave:** toxicidad de selenio, selenolevaduras, bolos intraruminales, glutatión peroxidasa

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
1. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1. Generalidades del selenio.....	5
3.1.1. Características.....	5
3.1.2. Distribución geológica.....	5
3.1.3. Fuentes de selenio.....	6
3.1.4. Esencialidad.....	7
3.2. Toxicidad.....	8
3.2.1. Toxicocinética.....	8
3.2.2. Toxicidad aguda.....	14
3.2.3. Toxicidad crónica.....	15
3.2.4. Concentraciones máximas tolerables.....	15
3.2.5. Diagnóstico.....	16
3.2. Generalidades de la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx).....	17
3.2.1. Clasificación.....	17
3.2.1. Importancia.....	17
3.2.2. Estructura y función.....	18
4. MARCO DE REFERENCIA.....	20
5. JUSTIFICACIÓN.....	24
6. META DEL PROYECTO.....	25
7. OBJETIVOS.....	25
7.1. Objetivo general:.....	25
7.2. Objetivos particulares:.....	25
8. HIPÓTESIS.....	26
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
9.1. Plan experimental.....	27
9.2. Características de las unidades experimentales.....	31
9.2.1. Tratamientos.....	31
9.3. Instalaciones y equipo.....	32
9.3.1. Glutatión peroxidasa:.....	33
9.3.2. Proteínas plasmáticas:.....	33
9.3.3. Selenio:.....	34
9.4. Condiciones fijas en la experimentación.....	34
9.4.1. Raza y Dieta.....	34
9.4.2. Sistema de explotación.....	34
9.4.3. Características de los bolos.....	35
9.4.4. Condiciones de muestreo.....	35
9.4.5. Condiciones de cuantificación.....	35
9.5. Factores controlados (Variables independientes controladas).....	36
9.6. Factores no controlados (Variables independientes no controladas).....	36
9.7. Respuestas evaluadas (Variables dependientes).....	36
9.8. Análisis estadístico.....	37
9.8. 1. Número de muestras y análisis realizados.....	37
10. RESULTADOS.....	40
10.1. Selenio.....	40
10.1.1. Comparación de medias.....	40
10.2. Glutatión peroxidasa.....	44

10.2.1. Comparación de medias.....	44
10.3. Proteínas plasmáticas.....	47
10.3.1. Comparación de medias.....	47
10.4. Peso.....	51
10.5. Signos clínicos.....	52
10.6. Correlación de variables de respuesta .....	52
10.6.1. Correlación entre Se y GSHPx .....	52
10.6.2. Correlación entre Se y proteínas plasmáticas .....	55
<b>11. DISCUSIÓN.....</b>	<b>60</b>
<b>11.1. Concentración de selenio plasmático .....</b>	<b>60</b>
11.1.1. Efecto de la dosis suministrada a las unidades experimentales .....	60
11.1.2. Tendencias de las concentraciones de selenio .....	62
<b>11.2. Actividad de la enzima GSHPx.....</b>	<b>63</b>
11.2.1. Efecto de tratamientos sobre la actividad de la enzima.....	63
11.2.2. Tendencias de la actividad de la enzima.....	64
<b>11.3. Concentración de proteínas plasmáticas .....</b>	<b>66</b>
11.3.1. Efecto de tratamientos sobre las concentraciones de proteínas plasmáticas.....	66
11.3.1. Tendencias de las concentraciones de proteínas plasmáticas .....	66
<b>11.4. Signos clínicos .....</b>	<b>67</b>
<b>11.5. Peso .....</b>	<b>67</b>
<b>11.6. Relaciones entre respuestas medidas.....</b>	<b>68</b>
11.6.1. Selenio – Glutación peroxidasa .....	68
11.6.2. Selenio – Proteínas plasmáticas.....	70
<b>12. CONCLUSIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo I: Detalles de las unidades experimentales .....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo II: Descripción de métodos de cuantificación .....</b>	<b>80</b>
<b>Anexo III: Medias de las respuestas medidas .....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo IV: Resultados analizados .....</b>	<b>90</b>
<b>Anexo V: Efecto del sexo y peso .....</b>	<b>93</b>
<b>Anexo VI: Matriz de correlaciones .....</b>	<b>97</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2. Selenoproteínas en mamíferos .....	19
Cuadro 3. Selenio total (mg) que recibieron las unidades experimentales.....	32
Cuadro 4. Número de muestras analizadas por grupo y sexo.....	37
Cuadro 5. Número final de muestras por sexo y grupo considerado para análisis estadístico ..	37
Cuadro 6. Prueba de efectos sobre la variable dependiente: Se plasmático .....	40
Cuadro 7. Contrastes entre medias de los tratamientos – Se plasmático .....	40
Cuadro 8. Diferencias mínimas significativas entre las medias de selenio plasmático en el tiempo .....	43
Cuadro 9. Prueba de efectos sobre la variable dependiente: GSHPx .....	44
Cuadro 10. Contrastes entre medias de los tratamientos – GSHPx .....	44
Cuadro 11. Diferencias mínimas significativas entre las medias de GSHPx en el tiempo .....	46
Cuadro 12. Prueba de efectos sobre la variable dependiente: Proteínas plasmáticas.....	47
Cuadro 13. Contrastes entre medias de los tratamientos – Proteínas plasmáticas.....	47
Cuadro 14. Diferencias mínimas significativas entre las medias de Proteínas plasmáticas en el tiempo .....	50
Cuadro 15. Medias de pesos (Kg) por grupo tomadas en periodos de 20 días.....	51

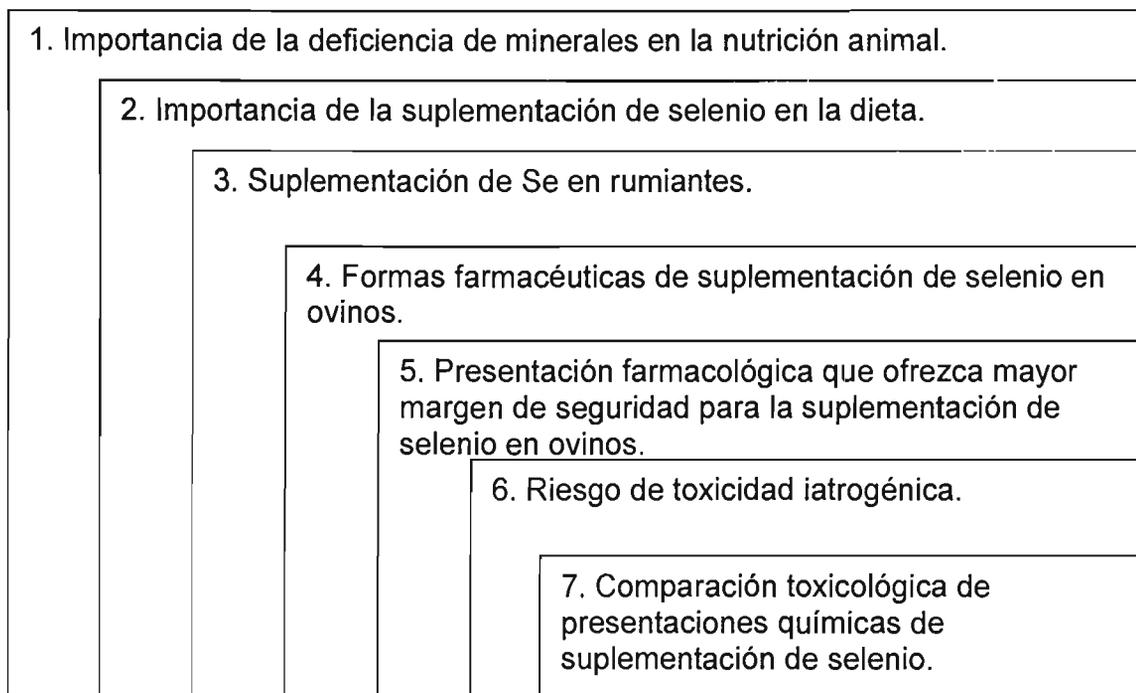
## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas metabólicas del selenio. ....	12
Figura 2. Estructura de la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx).....	18
Figura 3. Perfil de concentración de selenio plasmático en ovinos.....	41
Figura 4. Perfil de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma de ovinos.....	45
Figura 5. Perfil de concentración de proteínas plasmáticas en ovinos .....	48
Figura 6. Perfil de peso de unidades experimentales durante el estudio .....	51
Figura 7. Correlación entre selenio y glutatión peroxidasa del Grupo Control A .....	54
Figura 8. Correlación entre selenio y glutatión peroxidasa del Grupo Control B .....	54
Figura 9. Correlación entre selenio y glutatión peroxidasa del Grupo selenio orgánico .....	55
Figura 10. Correlación entre selenio y glutatión peroxidasa del Grupo selenio inorgánico.....	55
Figura 11. Correlación entre selenio y proteínas plasmáticas del Grupo Control A.....	58
Figura 12. Correlación entre selenio y proteínas plasmáticas del Grupo Control B.....	58
Figura 13. Correlación entre selenio y proteínas plasmáticas del Grupo selenio orgánico.....	59
Figura 14. Correlación entre selenio y proteínas plasmáticas del Grupo selenio inorgánico .....	59

## 1. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La delimitación del problema fue realizada considerando el marco de referencia del proyecto de investigación, y después de realizar su respectiva revisión bibliográfica.

A través del siguiente cuadro se puede comprender mejor la reducción de las áreas de estudio para la delimitación del problema:



El presente proyecto forma parte de un proyecto más general: el desarrollo farmacéutico de productos innovadores para la producción y salud veterinaria. Sin embargo, dentro del mismo existen ligas directas con el área de investigación toxicológica, por lo que “el encuadre” del proyecto bien puede ser la intersección entre el desarrollo farmacéutico de nuevos productos y la toxicología.

Por ello, se manejan aspectos que comprenden ambos campos de la investigación. Sin embargo, el principal objetivo del proyecto gira en torno a colaborar en las pruebas de seguridad de una nueva forma farmacéutica de suplementación de selenio para la producción y salud animal

## 2. INTRODUCCIÓN

Los elementos son necesarios para transformar la proteína y la energía de los alimentos en componentes del organismo o en otros productos como, leche, carne, crías, etc. Además, los minerales juegan un papel importante en los procesos que intervienen con los mecanismos de defensa de los organismos.

La cantidad de minerales en los rumiantes depende de la cantidad de éstos en los forrajes y éstos, a su vez, dependen de las concentraciones y otros factores de biodisponibilidad que se encuentran en el suelo. Así mismo, el estado fisiológico y de salud de los animales pueden contribuir a la presencia de deficiencias de minerales. El mejoramiento genético para optimizar la producción de las diferentes especies animales incrementa los requerimientos de minerales. Por estas razones, y en vista de que en nuestro país existen regiones carentes de ciertos minerales, es necesario suplementarlos en las dietas proporcionadas a los animales, o buscar métodos y/o técnicas para el correcto aporte de elementos minerales.

El selenio es un micromineral que frecuentemente se requiere suplementar en nuestro país; especialmente se requiere en especies rumiantes, avícolas y porcinas. Los borregos son especialmente susceptibles a la carencia de selenio, los jóvenes son aún más susceptibles, de ahí la necesidad de suplementar.

Existen diferentes presentaciones químicas de selenio para suplementar al ganado, se pueden dividir en forma general en fuentes inorgánicas y fuentes orgánicas. La suplementación de selenio puede realizarse a través del uso de fertilizantes con selenio en los suelos, suministrando selenio en la dieta de los animales, a través de formas farmacéuticas inyectables y como en el caso del presente trabajo, a través del uso de bolos de liberación lenta.

El uso de bolos de liberación lenta cobra una especial relevancia en el caso de rumiantes. Debido a las características anatómicas del tracto digestivo de los rumiantes, existe la posibilidad de mantener un dispositivo que libere lentamente

algún tipo de producto que proporcione beneficios para el ganado. Con el uso de este tipo de dispositivos se puede tener la ventaja de depositar directamente, al interior del animal, microminerales esenciales como lo es el selenio.

En todos los casos existe un riesgo latente al suplementar selenio, ya que como muchos microminerales, se tiene un mínimo margen de seguridad entre una dosis terapéutica y una dosis tóxica. Es importante contar con productos de suplementación de selenio que proporcionen un alto grado de seguridad, proporcionando dosis adecuadas de selenio, evitando su deficiencia, pero sin descuidar el riesgo de generar toxicidad.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Generalidades del selenio

##### 3.1.1. Características

El selenio (Se) fue descubierto por el químico sueco Jons Jacob Berzelius en 1817. El selenio es un metaloide incluido en el grupo VI de la tabla periódica de los elementos, tiene propiedades metálicas y no metálicas. El selenio es muy similar al azufre en sus propiedades químicas. Sus formas alotrópicas incluyen polvos rojos, cristales rojos, tierras cafés, y formas plateadas después de ser calentadas entre 200-220 °C. El selenio elemental puede ser oxidado a estados de oxidación de +4 ó +6. En el estado +4 el selenio existe como dióxido ( $\text{SeO}_2$ ), ácido de selenio ( $\text{H}_2\text{SeO}_3$ ), o sales de selenito ( $\text{SeO}_3^{-2}$ ). En el estado +6, el selenio existe como ácido selénico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) o selenato ( $\text{SeO}_4^{-2}$ ). En sus formas más reducidas (-2) el selenio existe como selenuro ( $\text{H}_2\text{Se}$ ), siendo un ácido fuerte incoloro. En la naturaleza se presenta tanto en forma inorgánica como orgánica (Health consultation, 2001; Humphreys , 1988; NRC, 1980).

##### 3.1.2. Distribución geológica

El selenio se encuentra distribuido en pequeñas cantidades en los suelos, prácticamente no se puede encontrar en estado nativo, por lo general se encuentra constituyendo parte mayoritaria de 40 minerales y como parte minoritaria de otros 37. El selenio se encuentra en mayor cantidad en suelos de rocas ígneas y sedimentarias, las concentraciones más frecuentes son de 0.1 a 2 ppm; aunque estas concentraciones pueden variar grandemente dependiendo de la región. Existen suelos que por su naturaleza son seliníferos, y generalmente son de tipo alcalino y contienen gran cantidad de carbonato de calcio en forma libre. Estos suelos se presentan en regiones de baja precipitación, normalmente menor a 8 cm de precipitación anual (NRC, 1980).

### 3.1.3. Fuentes de selenio

#### 3.1.3.1. Fuentes naturales

Los suelos ricos en selenio contienen selenio elemental, compuestos de selenitos y compuestos orgánicos. Existen piritas seleníferas y compuestos de selenio férrico.

Existen grandes cantidades de pastos y hierbas que son conocidas por acumular selenio. Las plantas de mayor acumulación son *Astragalus*, *Oonopsis*, *Stanleya*, *Xylorrhiza* y *Machaeranthera*, conteniendo entre 100-100,000 mg Se/Kg de tejido de planta. Otras que presentan una alta acumulación son *Aster*, *Gutierrezia*, *Atriplex*, *Grindelia*, *Castilleja* y *Comandra* conteniendo entre 25-100 mg Se/Kg de tejido de planta. Las plantas que se consideran no acumuladoras contienen menos de 25 mg Se/Kg de tejido de planta (Humphreys , 1988; NRC, 1980).

#### 3.1.3.2. Agricultura y ganadería

El selenio está presente en diferentes alimentos como la alfalfa, cebada, maíz, trigo, soya, y otras semillas, subproductos de origen animal como harinas de carne, pescado, subproductos de avicultura. La concentración depende de la zona geográfica en cuestión (EVM, 2003).

En la ganadería se cuenta con suplementos y a base de selenatos, selenitos y selenio orgánico; todos éstos a su vez en distintas presentaciones. Las concentraciones a suplementar se han estimado entre 0.1 a 0.3 ppm por Kg de alimento en base seca. Así mismo el selenio es empleado en la producción de insecticidas y molusquicidas.

#### 3.1.3.3. Industria y minería

El selenio es empleado en la elaboración de rectificadores, fotocopiadoras, celdas fotoeléctricas, vidrio, cerámica, pigmentos.

### 3.1.4. Esencialidad

Desde 1937, a través de las investigaciones hechas por Moxon, se han podido identificar y asociar las manifestaciones agudas y crónicas de la intoxicación por selenio, y de igual manera se comenzó a tomar medidas para su prevención. Fue hasta 1957 cuando se descubrió que el selenio era fisiológicamente esencial (Underwood, 1999). En 1973 se descubrió que el selenio era un constituyente esencial de la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx) (Köhrle, 1999). En los ochentas, se descubrió una gran cantidad de selenoproteínas, que indican que el selenio no desempeña un papel restringido a una función antioxidante (Tinggi, 2003). Las selenoproteínas que hasta la fecha se han podido identificar y clasificar son las glutatión peroxidases, las delodinasas, y otras, como las selenoproteínas P y W (ver Cuadro 1).

En la actualidad, el selenio es más conocido en los animales por sus carencias que por su toxicidad. En nuestro país, la deficiencia de selenio se ha reportado en forrajes y ganado rumiante de Veracruz, Hidalgo, Texcoco, Toluca y Tlaxcala (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001b; Werner, 1988). Se ha reportado que en el suroeste del estado de Tlaxcala se observó que la principal causa de muerte en corderos estaba asociada a distrofia muscular o enfermedad del músculo blanco; padecimiento asociado a la deficiencia de selenio (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001a). Recientemente se ha demostrado la necesidad de suplementación de selenio en el altiplano mexicano; Puebla y Tlaxcala (Bribiesca *et al.*, 2004). Sin embargo su papel como elemento tóxico puede ser de gran importancia en regiones de altas concentraciones de este elemento en los suelos como es el caso de algunas regiones de nuestro país; especialmente Zacatecas (Gartenberg *et al.*, 1990). También, cuando se realiza una suplementación inadecuada para la prevención de enfermedades, donde se puede llegar a producir toxicidad en el ganado; situación considerada en el presente estudio.

Se sabe que el selenio previene la presentación de la enfermedad del músculo blanco en rumiantes jóvenes, así como la miopatía en el caballo, diátesis exudativa en aves, hepatitis dietética en cerdos y necrosis hepática en ratas

(Buck *et al.*, 1981; Humphreys, 1988; NRC, 1980, Swanson, 1989). También se ha estudiado el papel del selenio en la parte integral de la enzima glutatión peroxidasa, y su importancia en contra del daño peroxidativo en los tejidos (Anzola, 2001; NRC, 1980). Se sabe que el selenio protege de la intoxicación por algunos metales pesados, tales como cadmio, mercurio y plata (Andersen, 1994; Selenio y ganado, 2001). Recientemente se han realizado estudios donde se investiga la posibilidad de prevenir el daño hepático producido por la toxicosis por cobre, empleando para ello la suplementación con selenio. Sin embargo los resultados no demostraron algún efecto para su prevención (Aburto *et al.*, 2001a; Aburto *et al.*, 2001b).

En nuestros días la suplementación se realiza con productos basados en selenitos o selenatos para prevenir su deficiencia, y así mismo se han empleado presentaciones orgánicas de selenio, las cuales incrementan la biodisponibilidad del elemento en los organismos en comparación a las presentaciones inorgánicas (Ullrey, 1992; Ullrey *et al.*, 1977; Underwood, 1999). En el caso específico de los rumiantes, se han realizado estudios comparativos entre diferentes métodos de suplementación, observándose mayor disponibilidad de selenio empleando selenato de bario por vía inyectada, y a su vez, mayor disponibilidad de selenio cuando éste es suministrado en forma orgánica por vía oral (McDowell, 2002).

## **3.2. Toxicidad**

### **3.2.1. Toxicocinética**

Todos los animales son susceptibles a la toxicosis por selenio, esto depende del grado de exposición al que se sea sujeto. La toxicidad en las distintas especies animales varía según la dieta que consumen, frecuencia de ingestión, características químicas del compuesto, presencia de sustancias que son sinérgicas o antagónicas al selenio (arsénico, azufre, metales pesados), susceptibilidad inherente del animal, y capacidad de eliminación tras la absorción. Se ha demostrado que una dieta rica en azufre puede decrecer la toxicidad de selenatos, pero no de selenitos o selenio orgánico. Así mismo se ha demostrado

que la metionina podría proteger en contra de la toxicidad por selenio, pero solamente cuando es adicionada vitamina E en la dieta del animal. Se ha observado que durante la ingestión de dietas altas en arsénico se incrementa la secreción biliar de selenio dentro del intestino. La toxicosis por selenio también se ha visto disminuida cuando hay interacción con mercurio, cadmio, cobre y plata (Andersen, 1994; Buck *et al.*, 1981; Palmer, 2001; Willson, 1987).

### 3.2.1.1. Absorción

El selenio puede ser absorbido por diferentes vías; por vía oral, vía respiratoria y vía dérmica. La forma de exposición más común, que ocurre en el ganado en condiciones normales, es por vía oral. Los humanos y los animales son capaces de absorber tanto selenio orgánico como inorgánico de los alimentos o del agua (Health consultation, 2001). La absorción del selenio ocurre a nivel de tracto gastrointestinal y tanto ésta, como su distribución, retención y eliminación varían con la presentación química ingerida (Behne *et al.*, 1990). Estos factores se ven también influenciados por otros elementos, como son los casos de arsénico y azufre, cuya presencia en la dieta del animal disminuye la tasa de absorción y retención del selenio en el organismo. Existen varios estudios realizados en animales experimentales y en humanos que mencionan que la selenometionina se absorbe de manera más eficiente que el selenito de sodio (Draft Toxicological Profile for Selenium, 2001). A nivel de intestino delgado, la selenometionina es absorbida en contra de un gradiente de concentración, no ocurriendo lo mismo para el caso de selenito y selenocisteína. Aún cuando se menciona que la selenocisteína no es absorbida mediante el mismo proceso que la selenometionina, las concentraciones totales de selenio por también suelen ser más altas que en el caso del selenito de sodio. Vendeland *et al.* (1992) observaron que la selenometionina y la selenocisteína eran absorbidas 10 veces más rápido que el selenito de sodio. En este sentido se puede entender que el selenio orgánico es absorbido en mayor proporción y más rápidamente que el selenio inorgánico.

En el caso de animales rumiantes debemos considerar que la absorción de selenio es significativamente menor que en el caso de animales monogástricos. Existen reportes que señalan menos de la mitad de capacidad de retención de selenio suministrado por vía oral, en comparación con animales monogástricos. Así mismo, se ha observado que el duodeno es el principal sitio de absorción, seguido del ciego, sin absorción a nivel de rumen o abomaso (NRC, 1980).

Se ha señalado que los microorganismos ruminales son los probables responsables de la baja absorción de selenio en rumiantes. Los microorganismos ruminales tienen la capacidad de reducir el selenio de la dieta en formas insolubles y no biodisponibles para el animal. De esta manera, la mayoría del selenio que se aporta en la dieta podría ser eliminado vía heces. Sin embargo, los microorganismos ruminales también tienen la capacidad de realizar lo contrario; incorporar selenio a las proteínas bacterianas, aumentando así su biodisponibilidad. Los procesos antes mencionados no están claramente explicados, pero se menciona que se puede aumentar o disminuir la biodisponibilidad de selenio en rumiantes, modificando el porcentaje de proteína y carbohidratos en la dieta (NRC, 1980).

Además de la acción de la microflora ruminal, existen otros factores que también deben ser considerados cuando se considera la biodisponibilidad de microelementos como el selenio. Entre estos factores están las necesidades propias del animal y la interacción con otros micronutrientes, como el cobre. Se ha observado que con dietas altas en este mineral aumenta la retención hepática de selenio. De igual manera deben ser consideradas las necesidades de yodo y selenio para un buen funcionamiento de la glándula tiroidea. La demanda de uno u otro de estos dos microminerales puede afectar al otro, dependiendo de la actividad de las enzimas y glutatión peroxidasas (Lee *et al.*, 2002).

### 3.2.1.2. Distribución

La mayoría de los estudios realizados en animales de laboratorio reportan patrones de distribución similares para los compuestos orgánicos e inorgánicos de

selenio. Las diferencias de distribución que son notables se dan en las proporciones que se acumulan en los tejidos (Draft Toxicological Profile for Selenium, 2001). Además de la forma química de administración, las diferencias en la distribución del selenio pueden depender de la vía de entrada, la dosis suministrada, el tiempo de exposición, así como los niveles previos de selenio en el organismo. Estudios realizados han demostrado que las concentraciones de selenio en hígado y músculo de ratas que recibieron selenometionina por vía oral por un periodo 3 a 6 semanas fueron mucho mayores a las concentraciones encontradas cuando se suministró selenito de sodio por el mismo tiempo (Vadenland *et al.*, 1992).

Cuando se comparan los resultados reportados en no rumiantes con aquellos reportados en rumiantes, es posible observar diferencias en el patrón de distribución del selenio. Mientras que en borregos se ha visto que del 75 al 85 % de selenio en eritrocitos está asociado con la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), en ratas prácticamente todo el selenio está asociado a esta enzima, y en humanos sólo un 10% está asociado a esta misma (NRC, 1980).

### 3.2.1.3. Metabolismo

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos ruminales tienen la capacidad de convertir fuentes inorgánicas de selenio a orgánicas, y de orgánicas a no orgánicas; e incluso, llevar al selenio hasta fuentes insolubles, prácticamente no biodisponibles para el animal. En los tejidos de los animales domésticos y en el hombre no se ha demostrado una conversión de formas inorgánicas a orgánicas, ni de orgánicas a inorgánicas (NRC, 1980). Tanto el selenio orgánico como el selenio inorgánico pueden ser incorporados en el organismo formando parte de selenoproteínas. Sunde (1990) realizó una clasificación definiendo a cuatro tipos de selenoproteínas: proteínas específicas de selenio, proteínas que incorporan selenocisteína en codones de cisteína, proteínas que incorporan selenometionina en las posiciones de metionina, y las proteínas que se ligan inespecíficamente a selenuro (Fig. 1). Las proteínas específicas de selenio incluyen a las enzimas

glutación peroxidasa, tioxin reductasa y hediondasas, las cuales constituyen fisiológicamente la clase más importante de selenoproteínas (Draft Toxicological Profile for Selenium, 2001).

De acuerdo con Sunde (1990) el selenio puede ser incorporado a las selenoproteínas a partir de fuentes inorgánicas y orgánicas. Cuando se trata de la incorporación de selenato, éste primero es reducido a selenito, el cual es reducido a su vez a selenuro vía glutatión. La selenometionina puede tomar dos caminos; el primero es el ser incorporada a proteínas de selenometionina, y el segundo el de ser transformada a selenocisteína mediante transulfuración. La selenocisteína puede ser incorporada a proteínas de selenocisteína, o también puede ser llevada a selenuro con la participación de la enzima selenocisteína β-liasas. El selenuro es el punto de encuentro en el metabolismo y formación de los cuatro grupos de selenoproteínas (Fig. 1). Cabe mencionar que la serina puede ser otra fuente para la formación de selenuro.

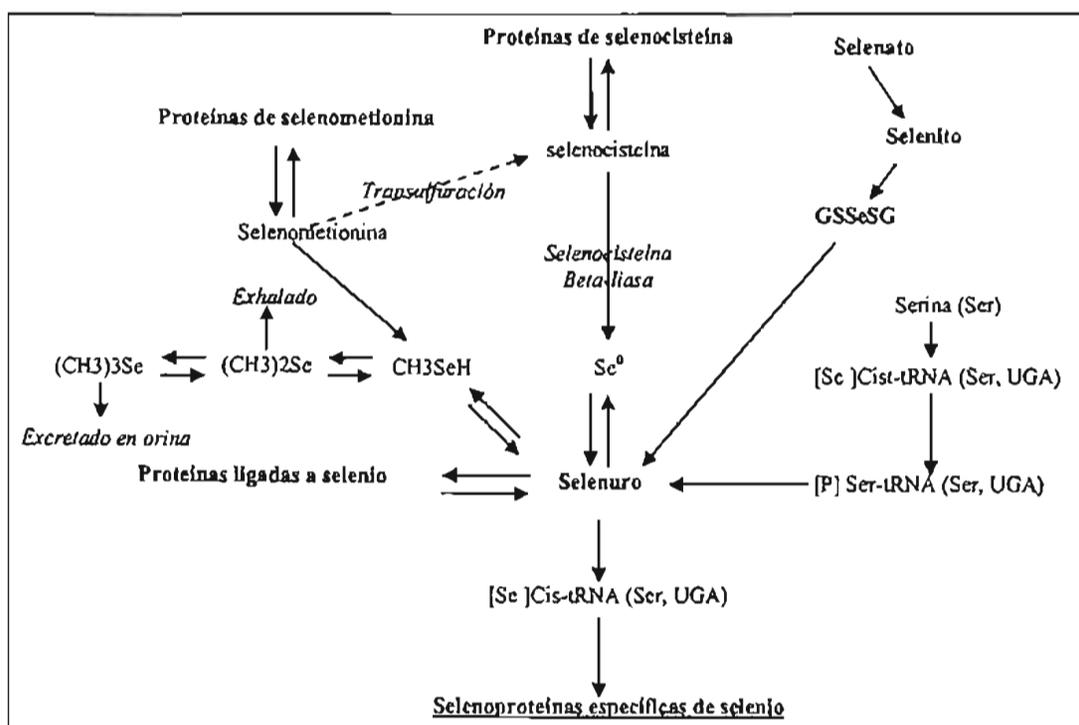


Figura 1. Rutas metabólicas del selenio.

Adaptado de Sunde, 1990.

#### 3.2.1.4. Eliminación y excreción

La eliminación del selenio se presenta a través de la orina, heces y aire expirado. La orina es la principal ruta de excreción tanto en especies rumiantes como en monogástricos. La mayor parte del selenio en heces es aquel que no ha sido absorbido, más una pequeña cantidad excretada en secreciones biliares, pancreáticas e intestinales (NRC, 1983; Palmer, 2001). Se ha demostrado que en el caso de humanos el sudor puede ser una fuente menor de eliminación (EVM, 1999). La tasa de eliminación del selenio depende de las concentraciones previas a la exposición, la vía de administración, el grado de exposición, el tiempo de exposición y la actividad física (NRC, 1983). El selenio que es transformado a selenuro es eliminado a través de un proceso de metilación. A través de este proceso se forma dimetilselenuro ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Se), el cual es exhalado, el trimetilselenuro ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Se) es excretado en orina (Draft Toxicological Profile for Selenium, 2001; Gyurasics, *et al.*, 1998). Casi todo el selenio excretado en heces de rumiantes se encuentra en forma insoluble. Aquí es importante señalar que se debe considerar la cantidad de selenio que no es absorbido por vía oral cuando se mide la concentración eliminada en heces; que como fue mencionado anteriormente, los rumiantes presentan una menor absorción por el efecto de los microorganismos ruminales.

#### 3.2.1.5. Mecanismo de toxicidad

Los mecanismos bioquímicos de una selenosis siguen siendo oscuros. Es probable que el selenio ejerza su efecto tóxico mediante la inhibición enzimática de los sistemas de oxireducción del organismo. Cuando el selenio se administra en forma de selenato, entra en el organismo y se reduce a selenito; así es llevado por el torrente sanguíneo 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 tales como la succinato deshidrogenasa. Parece existir

también una reducción importante de metionina en el hígado, debido supuestamente a la oxidación de los grupos sulfhidrilo. Recientemente se ha sugerido que la toxicidad del selenio podría deberse a la interacción del selenito con la glutatión para formar selenotrisulfidos activos para producir superóxidos y peróxidos de hidrógeno (Spalholz, 1994). El selenio está ligado a las proteínas, principalmente globulinas, se encuentra distribuido por todo el cuerpo, pero en algunos órganos en los que se deposita con mayor proporción son: hígado, riñones, bazo y corazón (Anzola, 2001). Las concentraciones de selenio en los tejidos tienden a reflejar las concentraciones de selenio en la dieta (NRC, 1983).

La intoxicación por selenio puede o no presentar signos característicos debido a que existen distintas presentaciones dependiendo de la dosis consumida y del tiempo de exposición.

### 3.2.2. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda es causada cuando se ingiere suficiente cantidad de selenio para causar signos severos y repentinos de intoxicación. Normalmente la muerte se presenta en pocas horas, se puede observar una muerte repentina, puede haber signos como disnea, ataxia, posturas anormales, postración y diarrea. La muerte se presenta por falla respiratoria. La intoxicación aguda también se puede presentar accidentalmente o experimentalmente, proporcionando grandes cantidades de selenio. La dosis mínima letal se ha señalado de 1.5 a 3.0 mg/kg de peso corporal, cuando las sales fueron proporcionadas en forma oral, subcutánea intraperitoneal, o intravenosa (Buck *et al.*, 1981; NRC, 1983; Selenio y ganado, 2001). Las lesiones observadas en la toxicidad aguda incluyen hemorragias petequiales en el endocardio, congestión aguda y hemorragias difusas en los pulmones. En los rumiantes, el omaso puede encontrarse congestionado y hemorrágico, y hay descamación de la mucosa del epitelio. Puede haber enteritis, hemorragia intestinal, y ocasionalmente colitis y proctitis. El hígado puede estar congestionado, hemorrágico, exhibiendo degeneración parenquimatosa, con necrosis focal. Los riñones presentan

degeneración parenquimatosa, hemorragias y nefritis (Humphreys , 1988; NRC, 1983; Willson, 1987).

### 3.2.3. Toxicidad crónica

Hay dos tipos de envenenamiento crónico que dependen de la forma química de selenio ingerido. El "vértigo ciego" ocurre cuando los animales ingieren durante varias semanas o meses compuestos de selenio solubles en agua que se encuentran de forma natural en plantas acumuladoras. Entre las plantas acumuladoras se encuentran muchas especies de *Astragalus* y algunas especies de *Machaeranthera*, *Haplopappus*, y *Stanleya*. En las primeras etapas de la enfermedad, los animales caminan errantes, frecuentemente en círculos, no prestan atención a los objetos que hay en su camino y tropezan con ellos o pasan por encima de los mismos. La temperatura corporal y la respiración pueden estar dentro de parámetros normales, pero finalmente los animales pueden llegar a morir (Buck *et al.*, 1981; NRC, 1983; Humphreys , 1988; Selenio y ganado, 2001).

Otra forma de intoxicación por selenio es la llamada enfermedad alcalina, la cual es más crónica que el vértigo ciego, y frecuentemente toma años para manifestarse por sí misma. Su causa se debe al consumo de plantas o granos que contienen selenio insoluble, unido a proteínas. Ésta es una consecuencia de consumir alimentos que van de 5 a 40 mg/Kg de selenio en periodos de semanas a meses. Los signos más importantes en el ganado incluyen cojera, malformación de pezuñas, pérdida de pelo y emaciación. Los borregos no exhiben usualmente lesiones en pezuña y lana, pero la reproducción está adversamente afectada (Buck *et al.*, 1981; NRC, 1983; Humphreys , 1988; Selenio y ganado, 2001).

### 3.2.4. Concentraciones máximas tolerables

Los requerimientos de selenio en la dieta van de 0.1 a 0.3 ppm en materia seca. Se han llegado a observar signos de toxicidad cuando se proporcionan 4 ppm de selenio. En forma general se considera que 2 ppm en materia seca es la

concentración máxima de tolerancia en todas las especies (Food and Drug Administration, 1989; NRC, 1980).

### 3.2.5. Diagnóstico

Para poder establecer el diagnóstico de intoxicación por selenio se deben considerar factores como la posibilidad de exposición a cualquier fuente de selenio. Para lo anterior, es importante considerar el lugar de procedencia de los animales o de los alimentos, suplementos y medicamentos empleados en los mismos. Es importante considerar las diferentes formas de presentación de la intoxicación por selenio, ya que dependiendo de éstas, los signos pueden o no ser manifiestos, o incluso, presentarse en diferentes periodos de tiempo. En dado caso, los signos clínicos serían considerados como significativos de la intoxicación por selenio. Así mismo las lesiones postmortem sirven para orientar el diagnóstico. Para poder confirmar el diagnóstico es necesario conocer las concentraciones de selenio en los alimentos. Para obtener el diagnóstico definitivo, las determinaciones de las concentraciones de selenio en los diferentes tejidos. Como se anotó anteriormente, las concentraciones de selenio en los tejidos varía dependiendo de la forma química de suministro, el tiempo de exposición y la dosis ingerida. La concentración de selenio también puede ser determinada de manera indirecta a través de la medición de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx), gracias a la elevada correlación entre ésta y la concentración de selenio en plasma y sangre completa (Daun and Akesson, 2004; Oblitas *et al.*, 2000).

Se debe diferenciar la intoxicación por selenio con otras enfermedades como neumonía, hepatitis crónica infecciosa, enterotoxemia, pastereiosis, ántrax, miositis eosinofílica y otros tipos de intoxicaciones como el ergotismo, molibdenosis, fluorosis, e incluso intoxicación por talio.

## **3.2. Generalidades de la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx)**

### **3.2.1. Clasificación**

Hasta la fecha se han clasificado por lo menos a 17 selenoproteínas; entre éstas a las glutatión peroxidadas (GSHPx) (Cuadro 1). La primer glutatión peroxidasa descubierta, que ahora es llamada glutatión peroxidasa clásica o celular (cGSHPx), es la enzima que de manera genérica se refieren la mayoría de las publicaciones. Además de ésta, se pueden identificar a la glutatión peroxidasa extracelular o plasmática (eGSHPx), la glutatión peroxidasa gastrointestinal (GPX-GI), y la glutatión peroxidasa fosfolípido-hidroperoxidasa (PHGPx) (Himeno and Imura, 2000).

### **3.2.1. Importancia**

Las enzimas GSHPxs actúan como parte de los mecanismos antioxidantes del organismo, éstas son capaces de reducir la cantidad peróxidos a nivel intra y extracelular (Allan *et al.*, 1999). La glutatión peroxidasa extracelular se localiza en plasma, y se considera que protege a los eritrocitos de los peróxidos que pudiese atacar externamente a sus membranas. También, estas enzimas constituyen un almacén de selenio en el organismo, que de alguna manera deben estar involucradas en los mecanismos de regulación de la toxicidad de este elemento.

### 3.2.2. Estructura y función

A excepción de la PHGPx, estas selenoproteínas son moléculas planas, formadas por cuatro subunidades idénticas de selenocisteína de 23 kDa; cada subunidad está ligada a un átomo de Se (Fig.2).

La enzima actúa oxidando al glutatión reducido, empleando para ello H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gamble *et al.*, 1997).

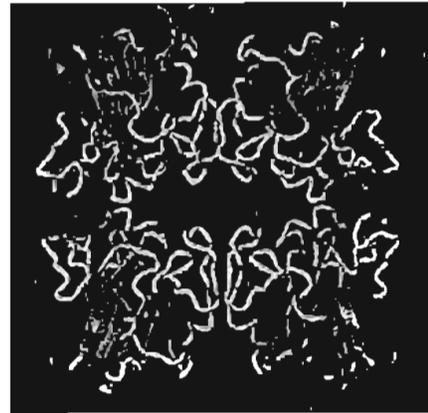
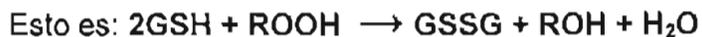


Figura 2. Estructura de la enzima glutatión peroxidasa (GSFPx)



GSH = Glutatión reducido
ROOH = Peróxido
GSSG = Glutatión oxidado
ROH = Alcohol

La actividad de la enzima varía dependiendo de la especie animal y el tejido en que se localiza. En estudios realizados en distintos tejidos de aves, cerdos, vacas y corderos se observó que la enzima tiene distintos patrones de actividad. Entre los resultados resalta que, en el caso de porcinos, la actividad enzimática más alta se observa en tejido hepático; mientras que en rumiantes, la mayor actividad se observa en tejido renal (Daun and Akesson, 2004a; Daun and Akesson, 2004b; Daun *et al.*, 2001).

**Cuadro 1. Selenoproteínas en mamíferos**

Selenoproteínas	Funciones	Localización
Glutatión peroxidasa		
Glutatión peroxidasa celular (cGPx o GPX1)	Remoción de hidroperóxidos	Ubicua
Glutatión peroxidasa gastrointestinal (GPx-GI o GPX2)	Remoción de hidroperóxidos	Gastrointestinal
Glutatión peroxidasa extracelular (eGSHPx o GPX3)	Remoción de hidroperóxidos	Plasma
Glutatión peroxidasa fosfolípido hidroperoxidasa (PHGPx o GPX4)	Remoción de fosfolípido hidroperóxidos	Ubicuita, testículos
5' Triyodotironina delodinasa (5'-DI)		
Tipo 1 5'-DI	Conversión de T4 a T3, T4 a rT3	Glándula tiroides, hígado, riñón
Tipo 2 5'-DI	Conversión de T4 a T3	Glándula pituitaria, SNC, tejido adiposo café
Tipo 3 5'-DI	Conversión de T4 a rT3	Placenta
Tioredoxina reductasa (TrxR)		
TRxR1	Reducción de tioredoxina	Ubicuita (citósol)
TRxR2	Reducción de tioredoxina	Ubicuita
TRxR3	Desconocida	Testículos
Selenoproteína P	Antioxidante (desconocida) Acarreadora de Se (desconocida)	Plasma
Selenoproteína W	Desconocida	Ubicuita, músculo
Selenofosfato sintetasa 2 (SPS2)	Síntesis de selenofosfato (desconocida)	Ubicuita
Selenoproteína 15-kDA	Desconocida	Ubicuita
Se1T	Desconocida	Desconocida
Se1R/SeX	Desconocida	Desconocida
Se1N	Desconocida	Desconocida

Adaptado de Himeno e Imura (2000)

#### 4. MARCO DE REFERENCIA

En el presente, aún se siguen documentando casos de contaminación por metales tóxicos y esenciales de agua y alimento, con repercusión en el ganado y el ser humano (Licata *et al.*, 2004). Además, existen ejemplos documentados de experiencias de toxicidad iatrogénica cuando se suplementa al ganado con selenio, en donde la mayoría de los casos se debe a errores en la dosificación y vía de aplicación (Smith, 1999). Los métodos profilácticos más comúnmente empleados para la prevención de la deficiencia de selenio en el ganado ovino son la administración parenteral de sales de selenio de liberación rápida: selenitos y selenatos de sodio y potasio, o de liberación lenta: selenato de bario (Jiménez *et al.*, 1988; EMEA, 1999; McDowell *et al.*, 2002; Olfield, 2002). De igual manera, estudios comparativos de biodisponibilidad del selenio en el ganado, empleando diferentes formas químicas de suplementación, indican que las formas químicas que proveen las concentraciones más altas de selenio por largos periodos de tiempo son el selenato de bario y el selenio orgánico (McDowell *et al.*, 2002). Cuando se suplementa selenio por vía oral se dispone de sales de selenito y selenato de sodio, así como selenio orgánico, principalmente como levaduras enriquecidas con selenio. El selenio orgánico ha demostrado tener mayor biodisponibilidad que el selenito de sodio. En estudios comparativos entre selenio orgánico y selenio inorgánico se ha demostrado que suplementando los mismos niveles de selenio en la dieta se observa mayor biodisponibilidad del primero. En muestras de sangre, la concentración de selenio y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en los eritrocitos fueron mayores en el caso de la suplementación con la fuente orgánica (Pehrson *et al.*, 1999; Selenio orgánico, 2001). Así mismo, se ha observado que los animales son capaces de excretar al selenio cuando se encuentra en exceso en los alimentos, es posible suponer que las formas orgánicas de selenio pueden llegar a ser menos tóxicas que las formas inorgánicas. Otro aspecto que debe ser considerado es la diferencia observada en el comportamiento de la formación y redistribución de las selenoproteínas en el

organismo, dependiendo de la forma química de suplementación (Zagrodzki *et al.*, 2000).

En el caso de los rumiantes se agrega un factor que debe ser considerado, y que cobra especial interés en el presente estudio. Los microorganismos del rumen tienen la capacidad de incorporar selenio inorgánico a los aminoácidos, pero éstos a su vez pueden desincorporar el selenio de los aminoácidos cuando se suplementa. La modulación de estos procesos no está claramente explicada, pero se han relacionado la disponibilidad y forma química de selenio presente en la dieta, así como el porcentaje de proteína y carbohidratos en la misma entre los factores más significativos que alteran la transformación de selenio por parte de los microorganismos. Además se ha observado influencias en el ganado por dos macrominerales, el calcio y el azufre. Estos dos macrominerales pueden llegar a incrementar o disminuir la absorción y concentración de selenio en los tejidos.

Anteriormente se señaló que existen elementos como el arsénico, el azufre y los metales pesados en la disminución de la toxicidad del selenio, pero también las dietas altas en proteínas aparentemente juegan un papel importante como factores protectores en contra de los efectos tóxicos del selenio. Estudios comparativos entre selenito de sodio, selenocisteína y selenometionina han mostrado resultados en donde los selenoaminoácidos muestran aparentemente un mayor rango de toxicidad, aún cuando con el caso de selenocisteína se pudo observar efectos adversos en el sistema succinoxidasa del hígado (Selenio orgánico, 2001).

La suplementación de selenio a través de sistemas de liberación lenta, como es el caso de los bolos intrarruminales, ha sido empleada desde finales de los años sesentas (Kuchel and Buckley, 1969). En la actualidad, el uso de este tipo de dispositivos es una práctica que se ha ido haciendo común, pero en la gran mayoría de los casos empleando fuentes inorgánicas de selenio (McDowell, 2002). Los bolos intrarruminales tienen la ventaja de proporcionar cantidades de selenio por periodos más prolongados de tiempo que cuando se suplementa en forma parenteral, por lo que se puede llegar a proporcionar mayor seguridad en la

prevención de deficiencia de selenio. Además, a través de los sistemas de liberación lenta se tiene la oportunidad de proporcionar varios nutrientes, antibióticos y antihelmínticos (Vandame and Ellis, 2004). La posibilidad de combinar una fuente orgánica de selenio, con mayor biodisponibilidad, con un sistema de liberación lenta provoca distintas interrogantes. Existe la posibilidad de proporcionar una fuente de selenio con mayor biodisponibilidad y por mayores periodos, pero así mismo se desconoce el efecto que tendrá el ambiente ruminal sobre dicha fuente.

Una limitante en la elaboración de bolos de selenio orgánico es el volumen de las selenolevaduras. Los bolos son una mezcla de hierro, cutina, estearato de magnesio y el principio activo, las selenolevaduras. La cutina debe “envolver” todos los ingredientes a través de la fusión por calor; si ésta no lograra integrar a todos los ingredientes, el bolo no podría ser elaborado con las características físicas requeridas para un dispositivo intraruminal de liberación lenta. La máxima proporción de selenolevaduras que han podido ser integradas en la mezcla de preparación de los bolos empleados en este experimento corresponde a 24.5 %. La concentración final de selenio de cada uno de los bolos (8.33 mg) resulta ser muy baja en comparación a otros sistemas de liberación lenta empleados en estudios anteriores (Blanco *et al.*, 1988; Judson *et al.*, 1991; Hemingway *et al.*, 2001). Sin embargo, en ninguno de los estudios anteriores se realizó una comparación con selenio orgánico, por lo que no tuvieron la limitante del volumen de selenolevaduras requerido en un sistema de liberación lenta.

Por todo lo anterior, se requiere investigar la posibilidad de contar con un producto de suplementación de selenio con mayor margen de seguridad. Una alternativa para la suplementación de selenio es la forma química orgánica, ya que con ésta se incrementa su biodisponibilidad, contemplando la posibilidad de que al mismo tiempo no se genere toxicidad. Es importante el asegurar que cuando se utilice cualquier forma de suplementación se tengan las bases para minimizar riesgos de intoxicación.

El efecto producido por el selenio en el ganado puede ser determinado considerando distintas manifestaciones bioquímico clínicas, entre estas la concentración de selenio en sangre y tejidos, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, la concentración de proteínas plasmáticas, la concentración de transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), así como la signología de los animales (Andres *et al.*, 1999; Korac and Buzadzic, 2002; Pavlata, 2000). En el caso del presente estudio, la toxicidad será valorada en función de las concentraciones de selenio en sangre y/o plasma, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y la concentración de proteínas plasmáticas, en asociación con las manifestaciones clínicas en los animales.

En distintos estudios se han observado altas correlaciones ( $r > 0.9$ ) entre las concentraciones de selenio sanguíneo con la actividad de la enzima GSHPx (Pavlata *et al.*, 2000; Oblitas *et al.*, 2000; Daun and Akesson, 2004). Estas correlaciones han sido realizadas con la actividad de la enzima GSHPx en sangre completa, por lo que en su gran mayoría se trata de glutatión peroxidasa citoplasmática (cGSHPx). De acuerdo con los resultados obtenidos por Gerlof (1992) y Jiménez *et al.* (1998) se estima que la actividad de la enzima GSHPx plasmática (eGSHPx) puede ser un indicador de lo que será la actividad de la enzima cGSHPx en el futuro.

Cuando se emplean dispositivos de liberación lenta se tiene la posibilidad de proveer de selenio al animal de una manera constante, y por tanto las concentraciones de selenio plasmático pueden llegar a ser un reflejo inmediato del efecto del dispositivo. De igual manera, es necesario medir la actividad de la enzima glutatión peroxidasa a nivel plasmático, y correlacionar dicha actividad con la concentración de selenio plasmático. Esta correlación será un indicador inmediato del efecto del dispositivo de liberación lenta sobre la actividad de la enzima glutatión peroxidasa plasmática del animal.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Elementos de justificación:

- Es necesario contar con un producto de suplementación de selenio para ovinos que proporcione un mayor margen de seguridad en su dosificación en comparación a los ahora existentes, especialmente en la prevención de toxicidad iatrogénica.
- Las fuentes inorgánicas y orgánicas de selenio pueden ser usadas para la suplementación del ganado, pero ante la posibilidad de existir ventajas en el manejo de la dosificación de selenio orgánico es importante conocer si estas ventajas son reales en el caso de rumiantes.
- Los dispositivos intraruminales de liberación lenta son una alternativa para suplementar al ganado con selenio, siempre y cuando se conozca su margen de seguridad; y por consecuencia, el presente trabajo ayudará a estimar la dosificación máxima para alcanzar el umbral de toxicidad del selenio cuando se emplean bolos intraruminales.
- La información que se obtenga del estudio comparativo de toxicidad subcrónica contribuirá a comprender mejor el mecanismo de toxicidad del selenio en animales rumiantes cuando se les proporcionan fuentes orgánicas e inorgánicas de selenio.

## **6. META DEL PROYECTO**

Conocer la dosificación máxima tolerable de selenio orgánico e inorgánico en ovinos cuando estos son suministrados por vía oral por medio de bolos intraruminales de liberación lenta, para así identificar si existen ventajas para la prevención de toxicidad en el uso de la forma orgánica de selenio.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1. Objetivo general:**

- Evaluar la diferencia de toxicidad entre selenio orgánico e inorgánico a través de su suplementación por medio de bolos intraruminales en ovinos y establecer los criterios de seguridad en el uso de ambos productos.

### **7.2. Objetivos particulares:**

- Evaluar si existen diferencias en las concentraciones sanguíneas de selenio en ovinos después de haber sido tratados con las mismas dosis de selenio orgánico e inorgánico a través de bolos intraruminales.
- Evaluar y correlacionar las manifestaciones bioquímico clínicas y signología de los animales tratados para poder valorar los efectos tóxicos de selenio orgánico e inorgánico.
- Determinar si existen ventajas en la disminución de la toxicidad entre la administración de selenio orgánico e inorgánico empleando bolos intraruminales en ovinos.

## 8. HIPÓTESIS

- La forma orgánica de selenio requerirá mayores concentraciones por vía oral para alcanzar el umbral de valores de intoxicación en comparación con la forma inorgánica.
- El tiempo requerido para llegar a alcanzar el umbral de concentraciones de intoxicación con selenio orgánico será mayor que con selenio inorgánico.
- Al conocer el umbral de seguridad de selenio orgánico se podrá dosificar al ganado con mayor seguridad.
- Es posible incrementar la biodisponibilidad de selenio en el ganado a través de la suplementación con selenio orgánico sin causar selenosis, aun a dosis consideradas tóxicas con las formas inorgánicas de selenio.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

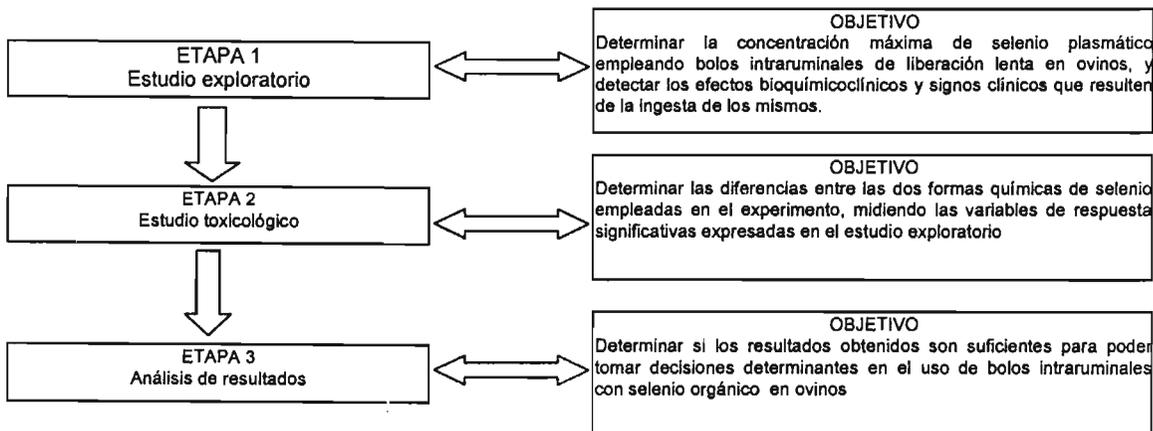
### 9.1. Plan experimental

La investigación planteada es de tipo experimental, por lo que es prospectiva y de tipo longitudinal. Las actividades fueron diseñadas en la forma que a continuación se detalla:

Para poder comparar la toxicidad de la forma orgánica e inorgánica de selenio en el presente trabajo, fue esencial contar con un diseño experimental que permitiera poder valorar y cuantificar las diferencias que se pudieran presentar entre una y otra forma química de éste. Fue importante el contar con las respuestas experimentales válidas y adecuadas que puedan ser analizadas estadísticamente, y de esta manera se puedan aceptar o rechazar las hipótesis planteadas en el proyecto, y que así mismo se cumpliera con requisitos estadísticos de validación del experimento (FDA, 1989).

Como principio, fue necesario contar con un esquema general de trabajo en el cual se establecieran las etapas fundamentales del experimento. Fue necesario identificar el planteamiento del cómo se rechazarían o aceptarían las hipótesis. Fue importante observar que variables de respuesta fueron más significativas en el análisis de resultados.

Por esta razón se plantearon tres etapas en el desarrollo del proyecto de investigación:



En el presente trabajo se suministraron dosis iguales de selenito de sodio y selenolevaduras a dos grupos de ovinos. Se planteó suministrar una misma dosis para ambos casos para poder establecer una comparación. La dosis que se suministró a los grupos de ovinos debía ser lo suficientemente alta para que en al menos alguno de los grupos se observaran concentraciones de selenio por arriba de lo normal, llegando incluso a límites de toxicidad.

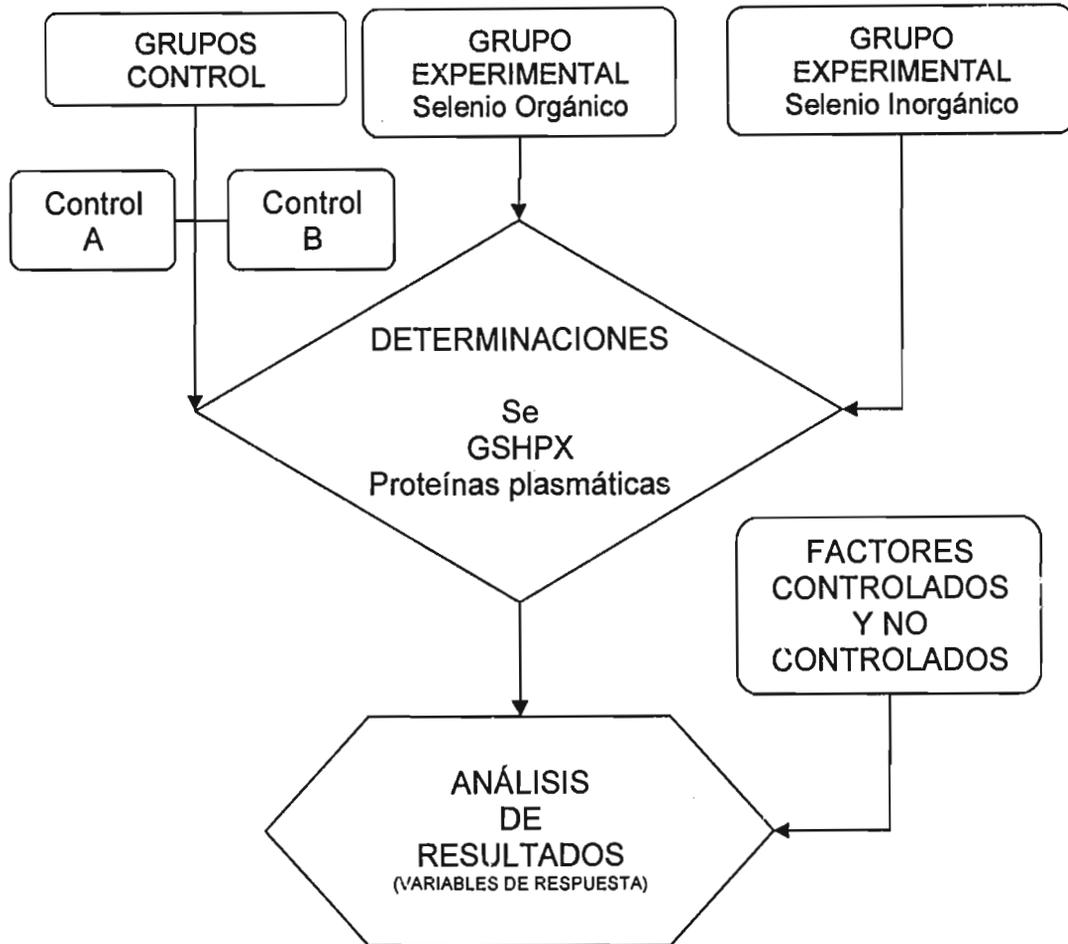
Por las razones arriba mencionadas fue necesario realizar, en una **primera etapa**, un estudio exploratorio que ayudó a corroborar que los bolos fabricados fueran aptos para ser administrados por vía oral en corderos, que así mismo, éstos no causaran alteraciones digestivas en los animales y que no fueran regurgitados. También se consideró cuantificar la concentración de selenio plasmático para prever la posibilidad de incrementos drásticos a nivel plasmático en por lo menos el primer mes de su suministro. En esta primera etapa se emplearon dos borregos machos y una hembra con cuatro semanas de destete y un peso promedio de 19 Kg. A uno de los borregos se le suministraron, sin problema alguno, dos bolos de selenio orgánico, a otro de los borregos se le suministraron dos bolos de selenio inorgánico y el tercero no se le suministró bolo alguno. Cada uno de los bolos suministrados tuvo una concentración equivalente a 4.3 mg de selenio. A cada uno de los borregos les fue tomada una muestra semanal por un periodo de seis semanas, y se les determinó la concentración de selenio plasmático. Después de tomar muestras sanguíneas se observó que ninguno de los animales regurgitó alguno de los bolos suministrados, y en ningún momento mostraron signología de intoxicación por selenio o alguna alteración digestiva. Las concentraciones de selenio plasmático que se observaron en ambos borregos (selenio orgánico y selenio inorgánico) fueron menores a 200 ng/g. Con esta información se continuó con la etapa experimental.

En una **segunda etapa** se consideró la experiencia observada en el estudio exploratorio. Gracias al estudio exploratorio se pudo verificar que es factible medir la toxicidad mediante las variables de respuesta seleccionadas en este estudio.

Para poder realizar una comparación entre selenio inorgánico y orgánico se formaron dos grupos experimentales y dos grupos control. Todos los grupos recibieron el mismo manejo, compartieron las mismas condiciones microambientales y fueron alimentados con la misma dieta. El único tratamiento diferente entre estos fue el suministro de selenio orgánico o inorgánico a los grupos experimentales. La forma de suministrar el selenio a los grupos experimentales fue realizada con la misma metodología. El detalle del diseño experimental se describe en este mismo capítulo.

En la **tercera etapa** se planteó el análisis de resultados, con lo cual se pudo determinar si se aceptaban o rechazaban las hipótesis planteadas en el presente proyecto. Lo anterior se resume en el siguiente diagrama:

## DIAGRAMA DE FLUJO DEL DESARROLLO DEL EXPERIMENTO



La descripción de cada uno de los elementos y pasos indicados en este diagrama de flujo se muestra a continuación:

## 9.2. Características de las unidades experimentales

Se utilizaron 18 borregos criollos con predominio fenotípico de la raza Columbia. Se contó con nueve hembras y nueve machos con promedio de peso de 33.0 y 31.7 Kg respectivamente (ver detalles en el Anexo I). Las unidades experimentales fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos: *Control A*, *Control B*, *Selenio orgánico* y *Selenio inorgánico*. Los tratamientos fueron los siguientes:

### 9.2.1. Tratamientos

- *Grupo control A*: No se le suministró producto alguno.
- *Grupo control B*: Sólo se suministró por vía subcutánea el equivalente a 0.1 mg/Kg PV de selenio del producto comercial Seleject® (*Animal Care products*).
- *Grupo selenio orgánico*: Se suministraron 4 bolos de selenio orgánico a base del producto comercial de selenolevaduras Sel-Plex® (*Alltech*), con un contenido equivalente a 8.33 mg de selenio. Además se suministró por vía subcutánea el equivalente a 0.1 mg/Kg PV de selenio del producto comercial Seleject® (*Animal Care products*).
- *Grupo selenio inorgánico*: Se suministraron 4 bolos de selenio inorgánico (selenito de sodio) con un contenido equivalente a 8.33 mg de selenio. Además se suministró por vía subcutánea el equivalente a 0.1 mg/Kg PV de selenio del producto comercial Seleject B12® (*Animal Care products*).

Cada una de las unidades experimentales de los grupos experimentales recibieron una sola aplicación al inicio del experimento (semana cero) con el producto comercial Seleject®. La dosis recomendada por vía SC de este tipo de productos es de 0.05 mg/ Kg PV en corderos y de 0.1 mg/ Kg PV en borregos adultos. Se decidió emplear la dosis máxima recomendada para adultos, esto es

una dosis equivalente a 0.1 mg/ Kg PV. El detalle de las concentraciones finales que recibió cada una de las unidades experimentales se pueden apreciar en la Cuadro 2.

**Cuadro 2. Selenio total (mg) que recibieron las unidades experimentales**

Identificación	Grupo	Se X Seleject	Se X bolos	Se total
371	4	4.0	33.32	37.32
709	2	2.4	0.00	2.40
713	4	2.0	33.32	35.32
715	3	4.4	33.32	37.72
717	1	0.0	0.00	0.00
721	3	2.8	33.32	36.12
723	2	3.6	0.00	3.60
725	3	3.2	33.32	36.52
726	1	0.0	0.00	0.00
728	3	3.6	33.32	36.92
730	3	3.6	33.32	36.92
732	4	2.8	33.32	36.12
734	2	3.2	0.00	3.20
738	4	2.8	33.32	36.12
876	4	2.8	30.57	33.37
878	1	0.0	0.00	0.00
879	3	2.8	33.32	36.12
880	4	3.6	33.32	36.92

No tratados (*Grupo 1*), tratados sólo con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo 2*), tratados con cuatro bolos de selenolevaduras y 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo 3*), tratados con cuatro bolos de selenito de sodio y 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo 4*).

### 9.3. Instalaciones y equipo

Para el desarrollo del experimento se contó con las instalaciones de los módulos de posgrado de ovinos y caprinos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, así como los laboratorios del LEM-Farmacia y Química Analítica de la misma Facultad.

En los laboratorios antes mencionados se hizo uso de refrigeradores, congeladores, destilador y desionizador de agua, mesas de trabajo, material de cristalería, y los siguientes materiales y equipos para cada prueba:

### 9.3.1. Glutación peroxidasa:

- Reactivos
  - Agua desionizada
  - Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); Laitzi
  - Glutación reducido; Sigma, # catálogo G470-5
  - Glutación reductasa; Sigma, # catálogo G366-4
  - Fosfato β-Nicotinamida adenina dinucleótida reducida (β-NADP); Sigma, # catálogo N-6505
  - Fosfato de sodio monobásico; Sigma
  - Fosfato de sodio dibásico; Sigma
  - Azida de sodio; Sigma
  - Ácido clorhídrico (HCl) 1N
- Materiales y equipo
  - Espectrofotómetro UV –visible; Varian, modelo CARY 1E
  - Micropipetas
  - Puntas para micropipetas
  - Matrices de aforo de 500 y 250 ml.
  - Frascos de vidrio

### 9.3.2. Proteínas plasmáticas:

- Reactivos
  - Agua destilada
  - Reactivo de Biuret; Hycel
  - Estándar de proteínas de 8 g/ml; Hycel
- Materiales y equipo
  - Espectrofotómetro UV –visible; Varian, modelo CARY 1E
  - Baño maría para incubación de muestras
  - Micropipetas
  - Puntas para micropipetas
  - Tubos de ensayo

### 9.3.3. Selenio:

- Reactivos
  - Agua desionizada
  - Ácido nítrico (NH<sub>3</sub>)
  - Ácido clorhídrico (HCl)
  - Peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
  - Hidróxido de sodio (NaOH)
  - Boruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>)
- Materiales y equipo
  - Horno de microondas; CEM, modelo Mars 5
  - Vasos de teflón; CEM, HP-500 Plus
  - Espectrofotómetro de absorción atómica; Varian, modelo SpectrAA-800
  - Generador de hidruros; Varian, modelo VGA77
  - Balanza analítica
  - Micropipetas
  - Puntas para micropipetas

Los métodos de cuantificación se describen en el Anexo II.

## 9.4. Condiciones fijas en la experimentación

### 9.4.1. Raza y Dieta

Como se mencionó anteriormente, los animales fueron de raza criolla con predominio fenotípico de la raza Columbia. En cuanto a la alimentación, todos los animales fueron alimentados a libre acceso con la misma dieta, la cual consistió de alfalfa achicalada, paja de avena y concentrado comercial Fatina® de Purina. En este sentido, se asumió que cada una de las unidades experimentales recibió selenio de la dieta en la misma proporción.

### 9.4.2. Sistema de explotación

Todos los animales fueron confinados en un solo corral en donde se les suministró alimento y agua a libre acceso.

#### 9.4.3. Características de los bolos

Los bolos fueron fabricados en las instalaciones de la LEM-Farmacia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo I. Los bolos fueron diseñados pensando en su uso en corderos, por lo que sus dimensiones fueron de 45.05 mm de longitud, 13.14 mm de ancho y 17.36 mm de espesor. Todos los bolos tuvieron un peso de 17 g, con una densidad mayor a 2.12 g/ml. Los bolos de selenio orgánico y de selenio inorgánico tuvieron la misma concentración equivalente de selenio; esta fue de 8.33 mg por bolo.

#### 9.4.4. Condiciones de muestreo

Las muestras fueron tomadas los días lunes, entre las 11:00 y las 13:00 hrs. Se tomó una muestra de sangre completa de la vena yugular por animal, utilizando para ello, tubos de autollenado al vacío de un volumen de 7 ml cada uno, empleando EDTA ( $K_3$ ) al 15 % como anticoagulante (BD Vacutainer®; Becton Dickinson). Se emplearon agujas estériles calibre 21<sub>G</sub> x 38 mm (Precision Glide Vacutainer®; Becton Dickinson). Las muestras recolectadas fueron identificadas con tinta indeleble, fueron transportadas en refrigeración para su inmediata centrifugación y separación del plasma, el cual fue conservado a -20 °C hasta su procesamiento.

#### 9.4.5. Condiciones de cuantificación

En todo momento se siguió con una rutina de trabajo. Las muestras fueron descongeladas y mantenidas en refrigeración. Una vez que las muestras se encontraban en estado líquido, estas fueron homogenizadas por agitación cada vez que se tomaba una alícuota para la determinación de cada una de las pruebas realizadas. Al evaluar la cantidad de trabajo se decidió procesar un bloque de 32

muestras por etapa: Primero se determinó la actividad de la enzima glutatión peroxidasa empleando la metodología descrita por Paglia and Valentine (1967). Al día siguiente se determinó la concentración de proteínas plasmáticas por el método de *Biuret*. Posteriormente se realizó la digestión de las 32 muestras del bloque. Finalmente, se realizó la lectura de las muestras digeridas para la determinación de la concentración de selenio plasmático.

El orden expuesto obedeció a que se consideró primordial la determinación de la actividad enzimática, por considerarse a ésta más sensible al mantenimiento en refrigeración en comparación con las otras dos pruebas realizadas. En todo momento se evitó volver a congelar y descongelar las muestras, por lo que los resultados de las lecturas fueron revisados permanentemente para la detección de posibles errores de medición.

#### **9.5. Factores controlados (Variables independientes controladas)**

- Tipo y dosis de selenio (ver tratamientos: sección 9.2.1)
- Tiempo de muestreo

A todos los grupos les fue tomada una muestra cada semana por un periodo de 14 semanas con la finalidad de ajustarse a el tiempo mínimo de 90 días para estudios de toxicidad crónica de dosis repetidas (VICH, 2004).

#### **9.6. Factores no controlados (Variables independientes no controladas)**

- Sexo
- Peso
- Edad

#### **9.7. Respuestas evaluadas (Variables dependientes)**

- Glutatión peroxidasa plasmática
- Proteínas plasmáticas
- Selenio plasmático
- Signos clínicos

## 9.8. Análisis estadístico

### 9.8. 1. Número de muestras y análisis realizados.

El número de muestras analizadas correspondió a **342**. Como a cada muestra se le determinó la concentración de Selenio, la actividad de la enzima Glutación Peroxidasa y la concentración de Proteínas, el número total de análisis correspondió a **1026**.

El detalle del número de cada respuesta medida por grupo y por sexo se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Número de muestras analizadas por grupo y sexo

SEXO	GRUPO				TOTAL
	Control A	Control B	Se orgánico	Se inorgánico	
Hembras	38	19	57	57	171
Machos	19	38	57	57	171
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>57</b>	<b>114</b>	<b>114</b>	<b>342</b>

Al realizar el primer análisis estadístico se observaron puntos aberrantes, los cuales fueron eliminados, reduciendo el número original de 342 a 335 resultados. El detalle de esta reducción se puede apreciar en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Número final de muestras por sexo y grupo considerado para análisis estadístico

SEXO	GRUPO				TOTAL
	Control A	Control B	Se orgánico	Se inorgánico	
Hembras	37	19	57	56	169
Machos	18	36	57	55	166
<b>TOTAL</b>	<b>55</b>	<b>55</b>	<b>114</b>	<b>111</b>	<b>335</b>

La estadística descriptiva de estos resultados aparece en el Anexo III.

### 9.8.2. Diseño

Inicialmente se utilizó un modelo en el cual se consideró el factor sexo en el análisis, pero al ver que no había interacción con el tratamiento, se decidió eliminarlo. Además, el peso inicial se utilizó como covariable, pero al igual que el sexo, éste no tuvo efectos significativos sobre el tratamiento, por lo que también fue eliminado del modelo final (ver Anexo V).

En el modelo final, los tratamientos fueron asignados a las unidades experimentales empleando un diseño completamente al azar. Se realizaron contrastes ortogonales de las medias para evaluar el efecto del tiempo sobre la concentración de selenio, la actividad de la GSHPx y la concentración de proteínas plasmáticas. Los datos fueron analizados mediante un diseño de mediciones repetidas en el tiempo, considerando a cada uno de los animales dentro de los tratamientos como término de error.

### 9.8.3. Modelo

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + T(a)_{ik} + (TS)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

**Donde:**

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta en el  $i$ -ésimo tratamiento, la  $j$ -ésima semana y el  $k$ -ésimo animal.

$\mu$  = Media poblacional

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i = 1, 2, \dots, T$ )

$S_j$  = Efecto de la  $j$ -ésima semana ( $j = 1, 2, \dots, S$ )

$T(a)_{ik}$  = Efecto aleatorio asociado al  $k$ -ésimo animal en el  $i$ -ésimo tratamiento

$(TS)_{ij}$  = Efecto de la intersección del  $i$ -ésimo tratamiento por la  $j$ -ésima semana

$\varepsilon_{ijk}$  = Error aleatorio asociado con el  $k$ -ésimo animal en el tratamiento  $i$  y la semana  $j$

#### 9.8.4. Procedimientos

El procedimiento empleado para este análisis fue *PROC MIXED* del paquete estadístico de SAS (1996) considerando un diseño completamente al azar con mediciones repetidas. Con el mismo paquete estadístico, utilizando *PROC CORR*, se examinó la correlación entre la concentración de selenio plasmático y al actividad de la GSHPx, así como la correlación de selenio y proteínas plasmáticas. En todas las comparaciones se estableció a  $P < 0.05$  como la significancia estadística.

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa SAS, 1996 y el programa *Statgraphics Plus* para *Windows 4*, versión profesional; 1994-1999.

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Selenio

#### 10.1.1. Comparación de medias

En el análisis de contrastes ortogonales se pudo apreciar que las variables consideradas en el modelo estadístico afectaron la respuesta medida (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Prueba de efectos sobre la variable dependiente: Se plasmático**

Efecto	P
Grupo	0.0030
Semana	< 0.0001
Grupo*Semana	0.0006

Aun cuando la concentración de Se fue afectada por el grupo (tratamiento) y la semana ( $P < 0.001$ ), esta información no se discutirá dado que la interacción grupo\*semana fue significativa ( $P = 0.0006$ ).

Los contrastes planteados señalaron que existieron diferencias significativas entre el grupo no tratado (Control A) y los grupos tratados con selenio, sin importar su forma química (Grupo control B, Se orgánico y Se inorgánico). Pero también se pudo detectar que existieron diferencias entre el grupo tratado solamente con la inyección de selenito de sodio y los grupos a los cuales se les suministraron bolos de selenolevaduras y bolos de selenito de sodio (Se orgánico y Se inorgánico). En este resultado no se observaron diferencias ( $P = 0.1952$ ) entre los grupos tratados con bolos de selenio orgánico y selenio inorgánico (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Contrastes entre medias de los tratamientos – Se plasmático**

Etiqueta	P
Control A vs Selenio	0.0198
Se orgánico vs Se inorgánico	0.1952
Control B vs Bolo	0.0049

Control A: sin tratamiento; Selenio: grupos tratados con selenio; Control B, Se orgánico y Se inorgánico; Se orgánico: grupo tratado con bolos de selenolevaduras y selenio inyectado; Se inorgánico: grupo tratado con bolos de selenito de sodio más selenio inyectado; Control B: grupo tratado con selenio inyectado; Bolo: grupos Se orgánico y Se inorgánico.

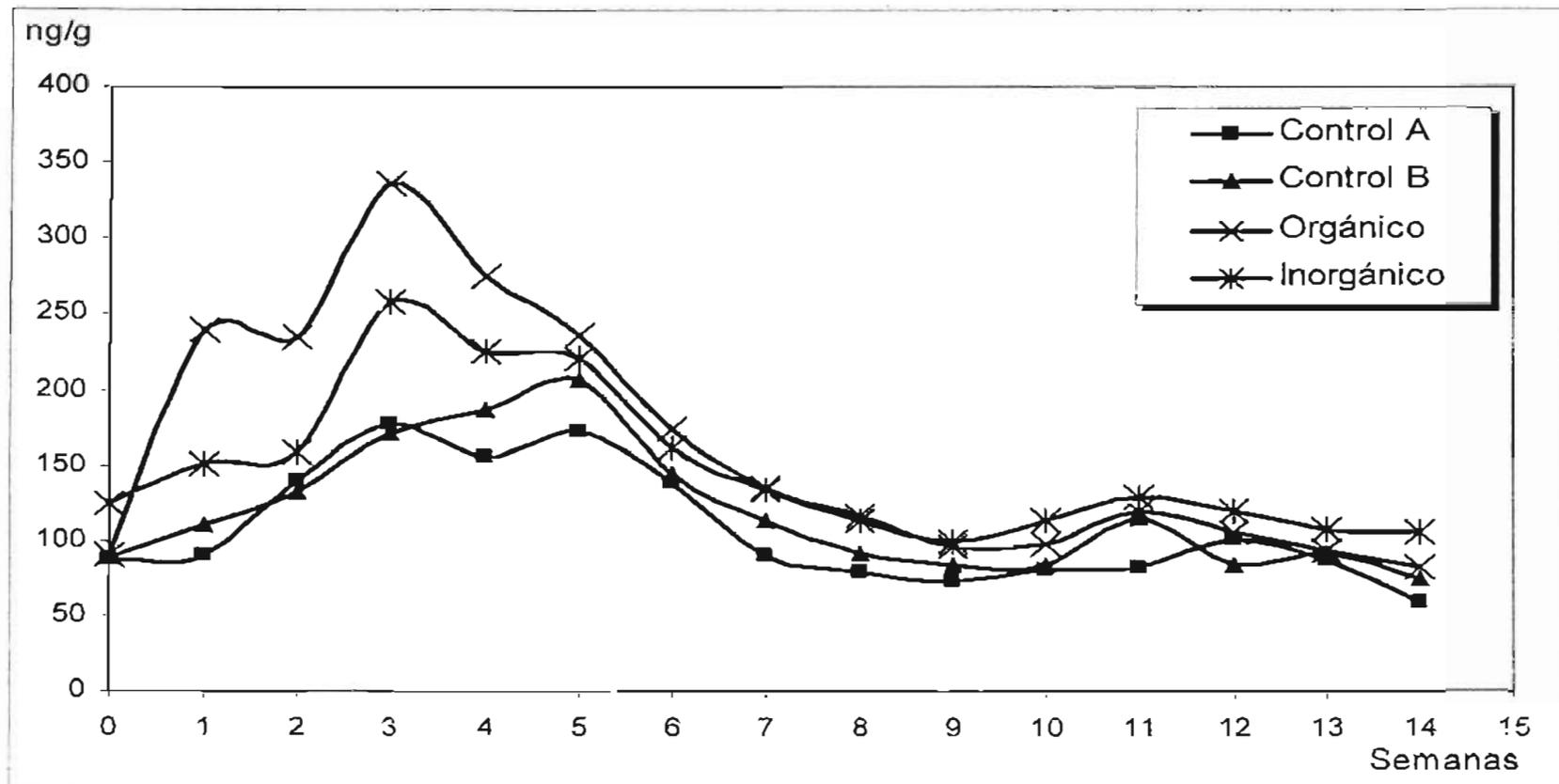


Figura 3. Perfil de concentración de selenio plasmático en ovinos

No tratados (*Grupo Control A*), tratados sólo con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Control B*), tratados con cuatro bolos de selenolevaduras y 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Se orgánico*), tratados con cuatro bolos de selenito de sodio y con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Se inorgánico*).

Al analizar las diferencias entre medias en cada semana, se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los dos grupos experimentales y los grupos control, entre la primera y la quinta semana, lo cual se observa en la Figura 3 y se detalla en el Cuadro 7.

Como se puede apreciar en la Figura 3, las concentraciones de selenio se incrementaron a partir de la primera semana, pero sólo el grupo de selenio orgánico presentó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros tres grupos. El grupo de selenio inorgánico solo mostró diferencias con el grupo control A (sin tratamiento de selenio). Estos mismos resultados se observaron en la segunda semana. En la tercera semana se observaron las concentraciones más altas que se presentaron a lo largo del estudio, observándose diferencias entre las concentraciones del grupo experimental de selenio orgánico con respecto a los otros tres grupos. El grupo experimental de selenio inorgánico mostró, a su vez, diferencias con los dos grupos control. En esta semana el grupo control B (sólo con tratamiento de *Seleject*®) presentó diferencias significativas con el otro grupo control (Control A). En la cuarta semana se observó que solo el grupo de selenio orgánico manifestó diferencias significativas con los otros tres grupos. El grupo de selenio inorgánico solo mostró diferencias con el grupo control A. Los grupos control no mostraron diferencias entre ellos. En la quinta semana sólo hubo diferencias significativas entre el grupo experimental de selenio orgánico y el grupo control A. A partir de la sexta semana ya no existieron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

Cuadro 7. Diferencias mínimas significativas entre las medias de selenio plasmático en el tiempo

GRUPO	SEMANA	GRUPO	SEMANA	P	GRUPO	SEMANA	GRUPO	SEMANA	P
1	0	2	0	0.9437	1	8	2	8	0.6805
1	0	3	0	0.8839	1	8	3	8	0.1610
1	0	4	0	0.1620	1	8	4	8	0.2088
2	0	3	0	0.9486	2	8	3	8	0.3530
2	0	4	0	0.1877	2	8	4	8	0.4335
3	0	4	0	0.1252	3	8	4	8	0.8580
1	1	2	1	0.5934	1	9	2	9	0.7514
1	1	3	1	< 0001	1	9	3	9	0.4120
1	1	4	1	0.0302	1	9	4	9	0.3435
2	1	3	1	< 0001	2	9	3	9	0.6490
2	1	4	1	0.1928	2	9	4	9	0.5603
3	1	4	1	<.0001	3	9	4	9	0.8761
1	2	2	2	0.8113	1	10	2	10	0.9200
1	2	3	2	0.0220	1	10	3	10	0.5700
1	2	4	2	0.5777	1	10	4	10	0.2479
2	2	3	2	0.0134	2	10	3	10	0.6512
2	2	4	2	0.7785	2	10	4	10	0.2983
3	2	4	2	0.0299	3	10	4	10	0.4708
1	3	2	3	0.0011	1	11	2	11	0.3120
1	3	3	3	0.1223	1	11	3	11	0.1723
1	3	4	3	0.4037	1	11	4	11	0.0867
2	3	3	3	< 0001	2	11	3	11	0.8421
2	3	4	3	0.0017	2	11	4	11	0.5818
3	3	4	3	0.0015	3	11	4	11	0.6668
1	4	2	4	0.3412	1	12	2	12	0.7201
1	4	3	4	<.0001	1	12	3	12	0.7809
1	4	4	4	0.0179	1	12	4	12	0.4705
2	4	3	4	0.0013	2	12	3	12	0.4366
2	4	4	4	0.1883	2	12	4	12	0.1990
3	4	4	4	0.0264	3	12	4	12	0.5335
1	5	2	5	0.2961	1	13	2	13	0.8872
1	5	3	5	0.0214	1	13	3	13	0.8003
1	5	4	5	0.0870	1	13	4	13	0.4388
2	5	3	5	0.2680	2	13	3	13	0.9289
2	5	4	5	0.5850	2	13	4	13	0.5414
3	5	4	5	0.5224	3	13	4	13	0.5230
1	6	2	6	0.8635	1	14	2	14	0.5669
1	6	3	6	0.1983	1	14	3	14	0.4018
1	6	4	6	0.3831	1	14	4	14	0.1301
2	6	3	6	0.2762	2	14	3	14	0.8090
2	6	4	6	0.5002	2	14	4	14	0.3111
3	6	4	6	0.6104	3	14	4	14	0.3713
1	7	2	7	0.4389					
1	7	3	7	0.0949					
1	7	4	7	0.1023					
2	7	3	7	0.4348					
2	7	4	7	0.4567					
3	7	4	7	0.9641					

## 10.2. Glutación peroxidasa

### 10.2.1. Comparación de medias

En este caso, solamente se observó efecto significativo ( $P < 0.0001$ ) del efecto semana sobre la actividad de la enzima GSHPx.

**Cuadro 8. Prueba de efectos sobre la variable dependiente: GSHPx**

Efecto	P
Grupo	0.8395
Semana	< 0.0001
Grupo*Semana	0.9947

La actividad de la enzima GSHPx no se vio afectada por el tratamiento (Grupo), por lo que al realizar contrastes entre las medias de los diferentes grupos tampoco se observaron diferencias entre estos (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Contrastes entre medias de los tratamientos – GSHPx**

Etiqueta	P
Control A vs Selenio	0.5314
Se orgánico vs Se inorgánico	0.8120
Control B vs Bolo	0.6159

Control A: sin tratamiento; Selenio: grupos tratados con selenio; Control B, Se orgánico y Se inorgánico; Se orgánico: grupo tratado con bolos de selenolevaduras y selenio inyectado; Se Inorgánico: grupo tratado con bolos de selenio de sodio más selenio inyectado; Control B: grupo tratado con selenio inyectado; Bolo: grupos Se orgánico y Se inorgánico.

Las tendencias de las concentraciones de glutación peroxidasa a través del tiempo que duró el estudio se pueden observar en la Figura 4.

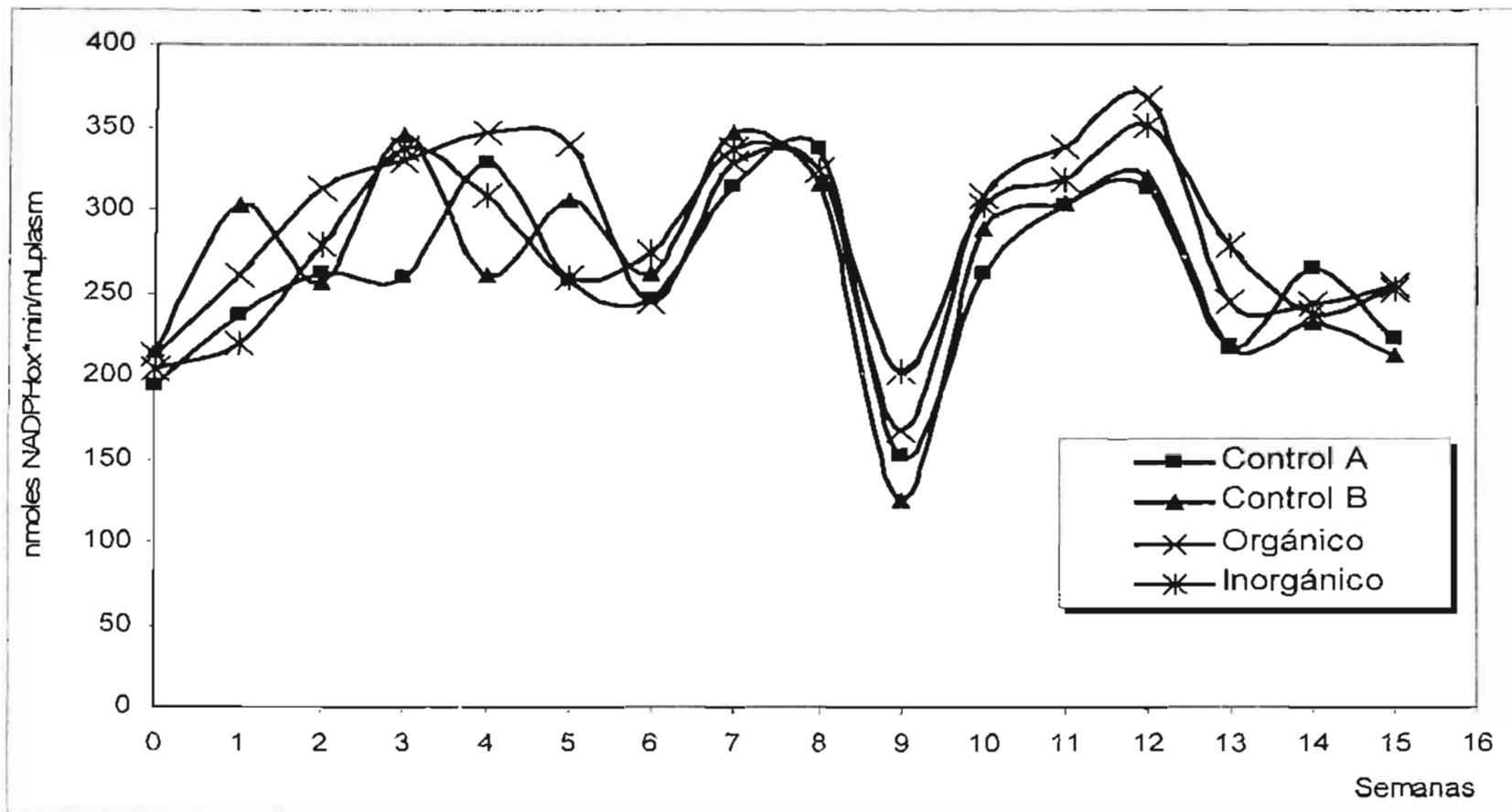


Figura 4. Perfil de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma de ovinos

No tratados (Grupo Control A), tratados sólo con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (Grupo Control B), tratados con cuatro bolos de selenolevaduras y 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (Grupo Se orgánico), tratados con cuatro bolos de selenito de sodio y con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (Grupo Se inorgánico).

Cuadro 10. Diferencias mínimas significativas entre las medias de GSHPx en el tiempo

GRUPO	SEMANA	GRUPO	SEMANA	P	GRUPO	SEMANA	GRUPO	SEMANA	P
1	0	2	0	0.7345	1	8	2	8	0.7292
1	0	3	0	0.7326	1	8	3	8	0.8151
1	0	4	0	0.8541	1	8	4	8	0.8027
2	0	3	0	0.9601	2	8	3	8	0.8682
2	0	4	0	0.8353	2	8	4	8	0.8808
3	0	4	0	0.8467	3	8	4	8	0.9844
1	1	2	1	0.3794	1	9	2	9	0.6703
1	1	3	1	0.6631	1	9	3	9	0.7750
1	1	4	1	0.7492	1	9	4	9	0.3511
2	1	3	1	0.5482	2	9	3	9	0.4372
2	1	4	1	0.2029	2	9	4	9	0.1552
3	1	4	1	0.3553	3	9	4	9	0.4281
1	2	2	2	0.9228	1	10	2	10	0.6653
1	2	3	2	0.3420	1	10	3	10	0.9156
1	2	4	2	0.7644	1	10	4	10	0.4431
2	2	3	2	0.2883	2	10	3	10	0.6938
2	2	4	2	0.6806	2	10	4	10	0.7889
3	2	4	2	0.4252	3	10	4	10	0.4182
1	3	2	3	0.2320	1	11	2	11	0.9862
1	3	3	3	0.2827	1	11	3	11	0.5085
1	3	4	3	0.2596	1	11	4	11	0.7705
2	3	3	3	0.7613	2	11	3	11	0.5214
2	3	4	3	0.8307	2	11	4	11	0.7858
3	3	4	3	0.9203	3	11	4	11	0.6507
1	4	2	4	0.2732	1	12	2	12	0.8758
1	4	3	4	0.7311	1	12	3	12	0.3297
1	4	4	4	0.7193	1	12	4	12	0.4848
2	4	3	4	0.1083	2	12	3	12	0.3710
2	4	4	4	0.3810	2	12	4	12	0.5583
3	4	4	4	0.4008	3	12	4	12	0.7044
1	5	2	5	0.4323	1	13	2	13	10000
1	5	3	5	0.1249	1	13	3	13	0.6160
1	5	4	5	0.8900	1	13	4	13	0.2579
2	5	3	5	0.5279	2	13	3	13	0.6160
2	5	4	5	0.4554	2	13	4	13	0.2579
3	5	4	5	0.1001	3	13	4	13	0.4396
1	6	2	6	0.7978	1	14	2	14	0.5989
1	6	3	6	0.9713	1	14	3	14	0.6879
1	6	4	6	0.5937	1	14	4	14	0.6048
2	6	3	6	0.7401	2	14	3	14	0.8369
2	6	4	6	0.8120	2	14	4	14	0.9283
3	6	4	6	0.4857	3	14	4	14	0.8871
1	7	2	7	0.5965					
1	7	3	7	0.7889					
1	7	4	7	0.6777					
2	7	3	7	0.7311					
2	7	4	7	0.8447					
3	7	4	7	0.8563					

Al analizar las 14 semanas, no se observaron diferencias significativas en las medias de los grupos de la actividad de la enzima GSHPx, ( Cuadro 10).

### 10.3. Proteínas plasmáticas

#### 10.3.1. Comparación de medias

En este caso, solamente se observó efecto significativo ( $P < 0.0001$ ) del efecto semana sobre la concentración de proteínas plasmáticas (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Prueba de efectos sobre la variable dependiente: Proteínas plasmáticas**

Efecto	P
Grupo	0.4714
Semana	< 0.0001
Grupo*Semana	0.3418

La concentración de proteínas plasmáticas no se vio afectada por el tratamiento (Grupo), por lo que al realizar contrastes entre las medias de los diferentes grupos tampoco se observaron diferencias entre estos (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Contrastes entre medias de los tratamientos – Proteínas plasmáticas**

Etiqueta	P
Control A vs Selenio	0.5989
Se orgánico vs Se inorgánico	0.1482
Control B vs Bolo	0.8109

Control A: sin tratamiento; Selenio: grupos tratados con selenio; Control B, Se orgánico y Se Inorgánico; Se orgánico: grupo tratado con bolos de selenolevaduras y selenio inyectado; Se Inorgánico: grupo tratado con bolos de selenio de sodio más selenio inyectado; Control B: grupo tratado con selenio inyectado; Bolo: grupos Se orgánico y Se Inorgánico.

Las tendencias de las concentraciones de proteínas plasmáticas a través del tiempo que duró el estudio se pueden observar en la Figura 5.

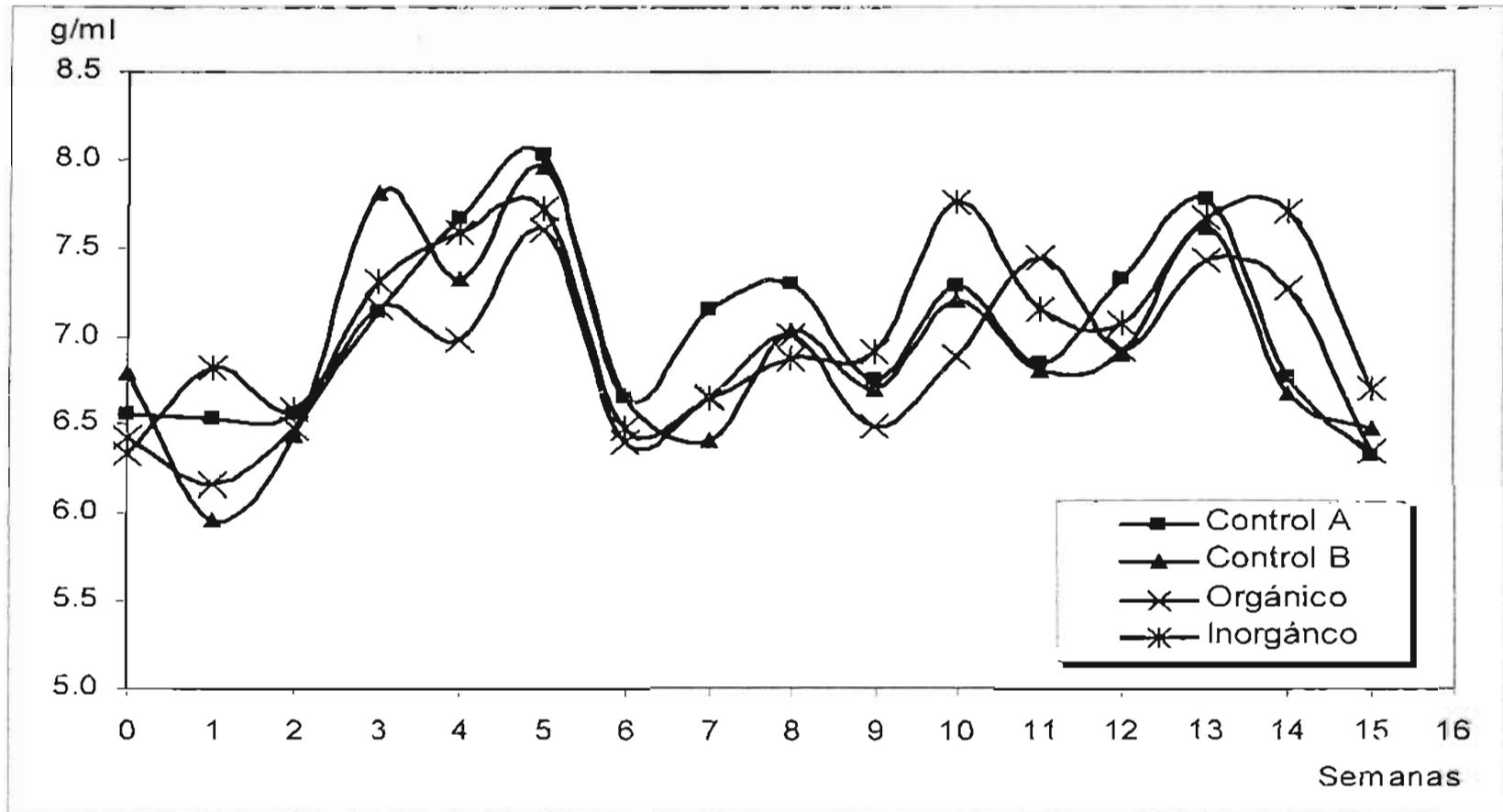


Figura 5. Perfil de concentración de proteínas plasmáticas en ovinos

No tratados (*Grupo Control A*), tratados sólo con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Control B*), tratados con cuatro bolos de selenolevaduras y 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Se orgánico*), tratados con cuatro bolos de selenito de sodio y con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Se inorgánico*).

Al analizar las diferencias entre medias en cada semana, se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo de Se inorgánico y los grupos Control B y Se orgánico. De igual manera, existieron diferencias entre el grupo Se orgánico y Se Inorgánico en la semana 10. Finalmente, se apreciaron diferencias significativas entre el grupo Se inorgánico y los grupos Control A y Control B (Figura 5 y Cuadro 13).

Cuadro 13. Diferencias mínimas significativas entre las medias de Proteínas plasmáticas en el tiempo

GRUPO	SEMANA	GRUPO	SEMANA	P	GRUPO	SEMANA	GRUPO	SEMANA	P
1	0	2	0	0.5923	1	8	2	8	0.5414
1	0	3	0	0.7223	1	8	3	8	0.4508
1	0	4	0	0.5368	1	8	4	8	0.2651
2	0	3	0	0.3306	2	8	3	8	0.9607
2	0	4	0	0.2171	2	8	4	8	0.6814
3	0	4	0	0.7478	3	8	4	8	0.6581
1	1	2	1	0.2352	1	9	2	9	0.9017
1	1	3	1	0.3267	1	9	3	9	0.4854
1	1	4	1	0.4382	1	9	4	9	0.6965
2	1	3	1	0.6388	2	9	3	9	0.5788
2	1	4	1	0.0448	2	9	4	9	0.5943
3	1	4	1	0.0323	3	9	4	9	0.1836
1	2	2	2	0.7933	1	10	2	10	0.8573
1	2	3	2	0.8276	1	10	3	10	0.2403
1	2	4	2	0.9557	1	10	4	10	0.2169
2	2	3	2	0.9325	2	10	3	10	0.3333
2	2	4	2	0.7203	2	10	4	10	0.1495
3	2	4	2	0.7378	3	10	4	10	0.0034
1	3	2	3	0.2445	1	11	2	11	0.9370
1	3	3	3	0.8352	1	11	3	11	0.1180
1	3	4	3	0.8792	1	11	4	11	0.4271
2	3	3	3	0.0862	2	11	3	11	0.0982
2	3	4	3	0.2040	2	11	4	11	0.3761
3	3	4	3	0.6278	3	11	4	11	0.3440
1	4	2	4	0.4280	1	12	2	12	0.5654
1	4	3	4	0.0726	1	12	3	12	0.5739
1	4	4	4	0.7275	1	12	4	12	0.8064
2	4	3	4	0.3759	2	12	3	12	0.9253
2	4	4	4	0.5880	2	12	4	12	0.6496
3	4	4	4	0.0911	3	12	4	12	0.6588
1	5	2	5	0.8905	1	13	2	13	0.7187
1	5	3	5	0.2653	1	13	3	13	0.3593
1	5	4	5	0.4607	1	13	4	13	0.7771
2	5	3	5	0.3393	2	13	3	13	0.6160
2	5	4	5	0.5596	2	13	4	13	0.8944
3	5	4	5	0.6756	3	13	4	13	0.4375
1	6	2	6	0.9839	1	14	2	14	0.8392
1	6	3	6	0.5086	1	14	3	14	0.1787
1	6	4	6	0.6514	1	14	4	14	0.0141
2	6	3	6	0.4938	2	14	3	14	0.1148
2	6	4	6	0.6347	2	14	4	14	0.0073
3	6	4	6	0.7976	3	14	4	14	0.1693
1	7	2	7	0.0927					
1	7	3	7	0.1998					
1	7	4	7	0.1881					
2	7	3	7	0.5074					
2	7	4	7	0.5296					
3	7	4	7	0.9664					

#### 10.4. Peso

Todas las unidades experimentales fueron pesadas cada 20 días, con un total de seis pesajes. Las medias de los grupos se observan en el Cuadro 14.:

Cuadro 14. Medias de pesos (Kg) por grupo tomadas en periodos de 20 días

Grupo	No. De Pesaje					
	1	2	3	4	5	6
Control A	30.2	33.2	36.2	38.5	40.5	45.8
Control B	24.7	30.5	34.3	36.2	38.5	44.3
Orgánico	32.9	35.8	39.6	40.8	43.4	47.9
Inorgánico	26.0	28.7	32.9	35.0	37.7	42.9

Las tendencias de las medias de los pesos de los grupos se pueden apreciar en la Figura 6. El análisis de varianza no se observó que existieran diferencias significativas entre grupos ( $p > 0.05$ ).

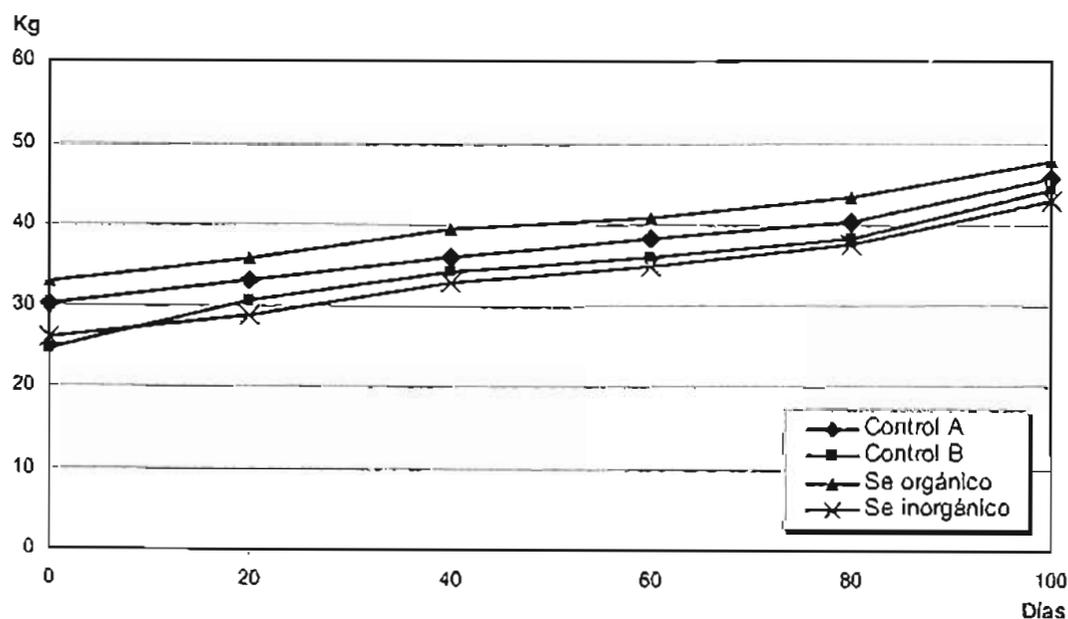


Figura 6. Perfil de peso de unidades experimentales durante el estudio

No tratados (*Grupo Control A*), tratados sólo con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Control B*), tratados con cuatro bolos de selenolevaduras y 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Se orgánico*), tratados con cuatro bolos de selenito de sodio y con 0.1 mg/Kg PV de *Seleject*® (*Grupo Se inorgánico*).

## 10.5. Signos clínicos

No se observaron signos clínicos asociados a una probable intoxicación por selenio durante el desarrollo del experimento.

## 10.6. Correlación de variables de respuesta

Se obtuvo una matriz de correlaciones por semana y por grupo (ver Anexo VI) de la cual se graficaron los resultados, considerando los valores de correlación (valores de  $r$ ) y su significancia (valores de  $P$ ).

### 10.6.1. Correlación entre Se y GSHPx

#### Grupo Control A:

En la Figura 7 se puede observar que solamente se observó una correlación significativa ( $r = 0.9924$ ;  $P = 0.0248$ ) en la semana 1 del estudio. Aun cuando en el resto de las semanas se observaron correlaciones no significativas ( $P > 0.05$ ), Se puede observar que existieron correlaciones directas desde la semana 1 a la 6, cambiando a inversa de la semana 7 a 9, para posteriormente ser directa en la semanas 10 y 11, y terminando en inversa en la semana 13. En este grupo faltaron valores para realizar los cálculos en las semanas 3, 12, y 14.

#### Grupo Control B:

En la Figura 8 se puede apreciar que en este grupo sólo se observó una correlación significativa de las variables en la semana 0 ( $r = 0.9991$ ;  $P = 0.0256$ ). Considerando un valor de  $P < 0.3$ , en las semanas 4, 5 y 8 se observó una correlación inversa y en la semana 14 se observó una correlación directa. En las semanas 1 y 7 faltaron valores para realizar los cálculos.

#### Grupo Se orgánico:

Como se puede apreciar en la Figura 9, no se observó correlación significativa ( $P > 0.05$ ) en alguna de las semanas de este grupo. Aun cuando no fueron significativos estos resultados, cabe destacar que la mayoría de las correlaciones directas se observan en las primeras seis semanas (exceptuando las semanas 3 y 4), para después alternar entre correlación indirecta y directa en las siguientes semanas (indirecta: semanas 7, 8, 9, 11 y 14; directa: semanas 10, 12 y 13).

#### Grupo Se inorgánico:

En la Figura 10 se observa que, en este caso, la correlación de las variables en las semanas 4 y 6 fue significativa ( $P < 0.05$ ), con una correlación indirecta ( $P = -0.9012$  y  $-0.8462$ , respectivamente). Llama la atención, sabiendo que estos resultados no son significativos, que en las primeras nueve semanas (excluyendo la semana 1) la mayoría de los valores de  $r$  fueron negativos, y después de esta semana predominó una correlación directa (excluyendo la semana 12).

### Control A

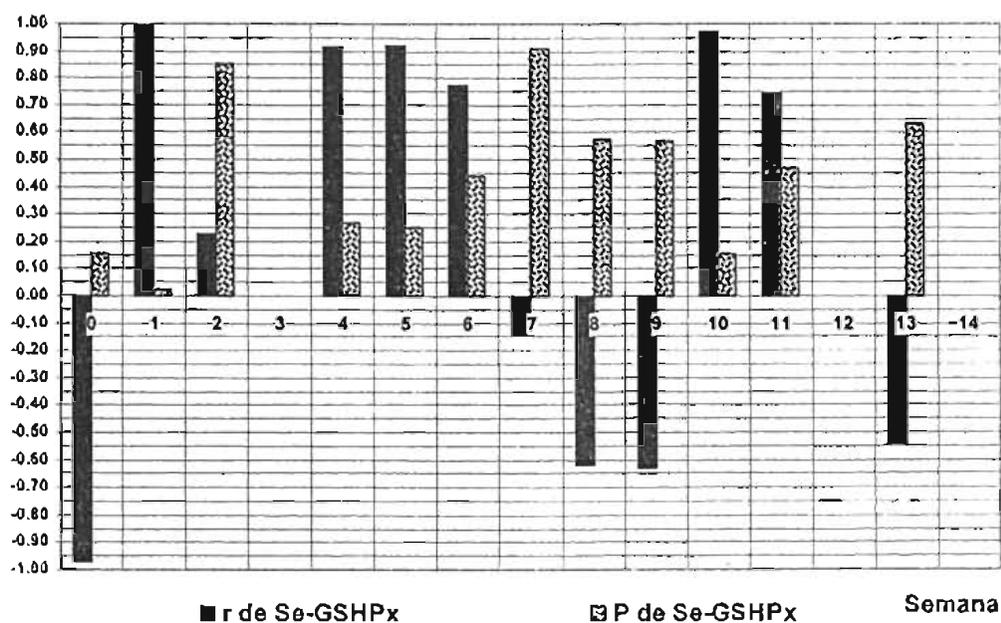


Figura 7. Correlación entre selenio y glutatión peroxidasa del Grupo Control A

### Control B

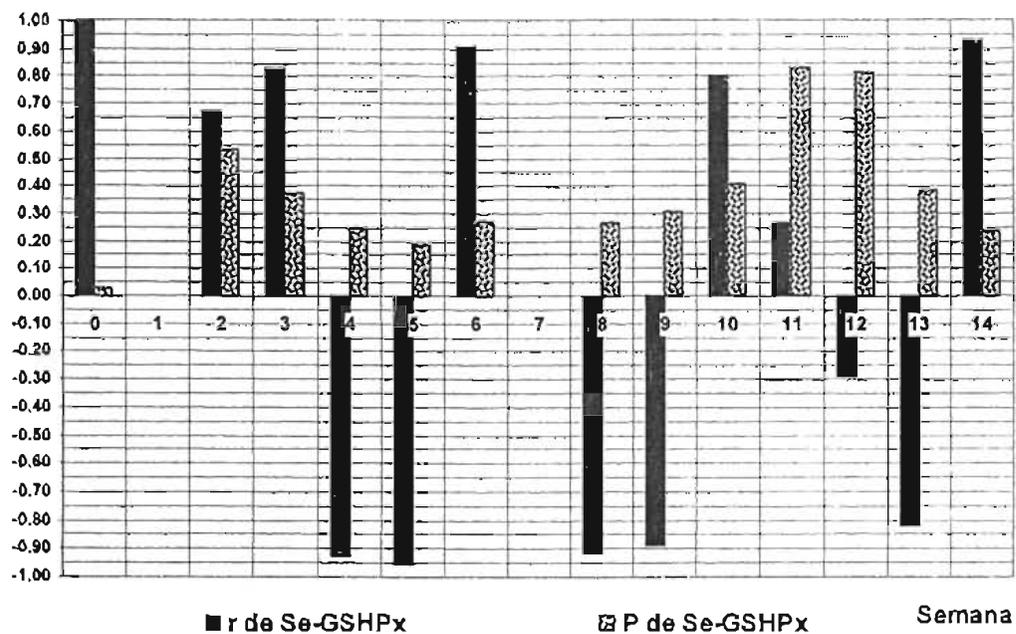


Figura 8. Correlación entre selenio y glutatión peroxidasa del Grupo Control B

### Se orgánico

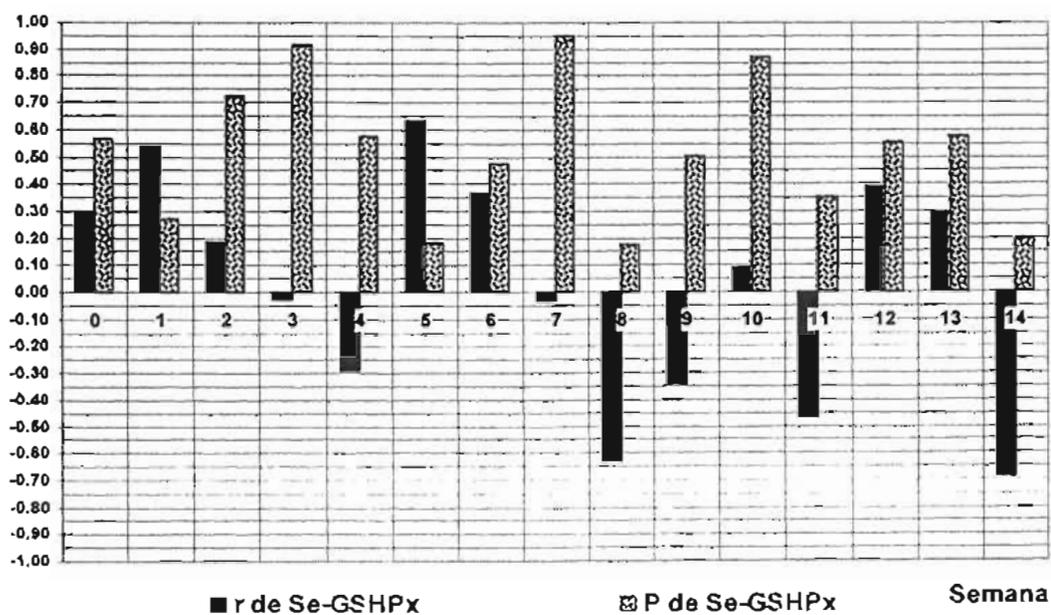


Figura 9. Correlación entre selenio y glutatión peroxidasa del Grupo selenio orgánico

### Se inorgánico

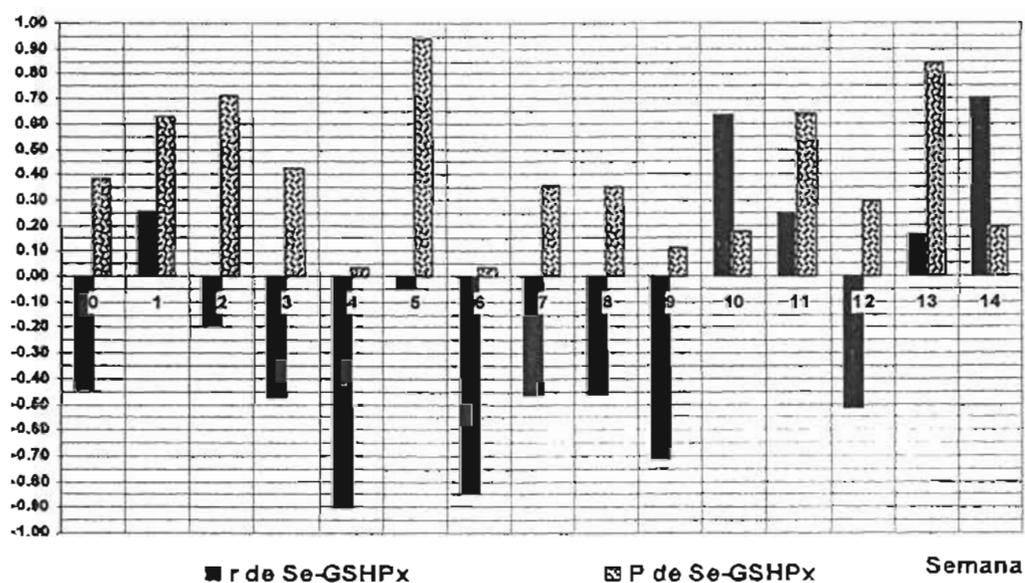


Figura 10. Correlación entre selenio y glutatión peroxidasa del Grupo selenio Inorgánico

#### 10.6.2. Correlación entre Se y proteínas plasmáticas

#### Grupo Control A:

Como se observa en la Figura 11, ninguna de las correlaciones resultó significativa ( $P > 0.05$ ) en el tiempo que duró el estudio. Entre las semanas 2 y 7 se observó una correlación directa de las variables con valores de  $P < 0.5$ . En las semanas 8, 9, y 10 se observó una correlación indirecta ( $P$  entre 0.6006 y 0.6338). En las semanas 11 y 13, esta correlación cambió nuevamente a ser directa ( $r = 0.7598$  y  $0.9099$ ;  $P = 0.4506$  y  $0.2724$ , respectivamente). Faltaron valores para realizar los cálculos en las semanas 3, 12 y 14.

#### Grupo Control B:

En la Figura 12 se aprecia que en este caso solamente se observó una correlación significativa en la semana 2 ( $r = 0.99718$ ,  $P = 0.0478$ ). Aunque en el resto de las semanas no existieron correlaciones significativas, se observa que en las 0 y 2 se inicia con una correlación directa, en las semanas 3 y 4 cambia a indirecta, en la semana 5 es directa, en la semana 6 es indirecta, en las semanas 7, 8 y nueve cambia nuevamente a directa, para finalmente observarse una correlación directa de la semana 10 a la 14. En la semana 1 faltaron valores para realizar los cálculos.

#### Grupo Se orgánico:

En la Figura 13 se observa que aunque sólo se observaron correlaciones significativas ( $P < 0.05$ ) en las semanas 9 y 11, la mayoría de éstas fueron directas, exceptuando las semanas 2, 6 y 10.

#### Grupo Se inorgánico:

Como se puede apreciar en la Figura 14, los valores de P fueron mayores a 0.05, pero se pudo apreciar que la mayoría de las correlaciones fueron directas, exceptuando las semanas 2, 4, 6 y 7.

### Control A

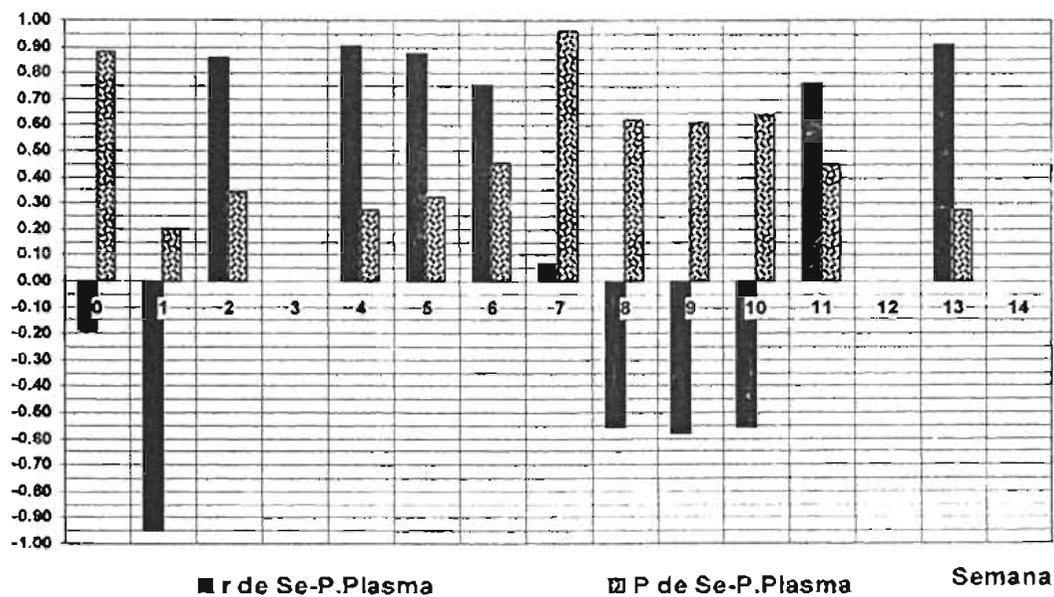


Figura 11. Correlación entre selenio y proteínas plasmáticas del Grupo Control A

### Control B

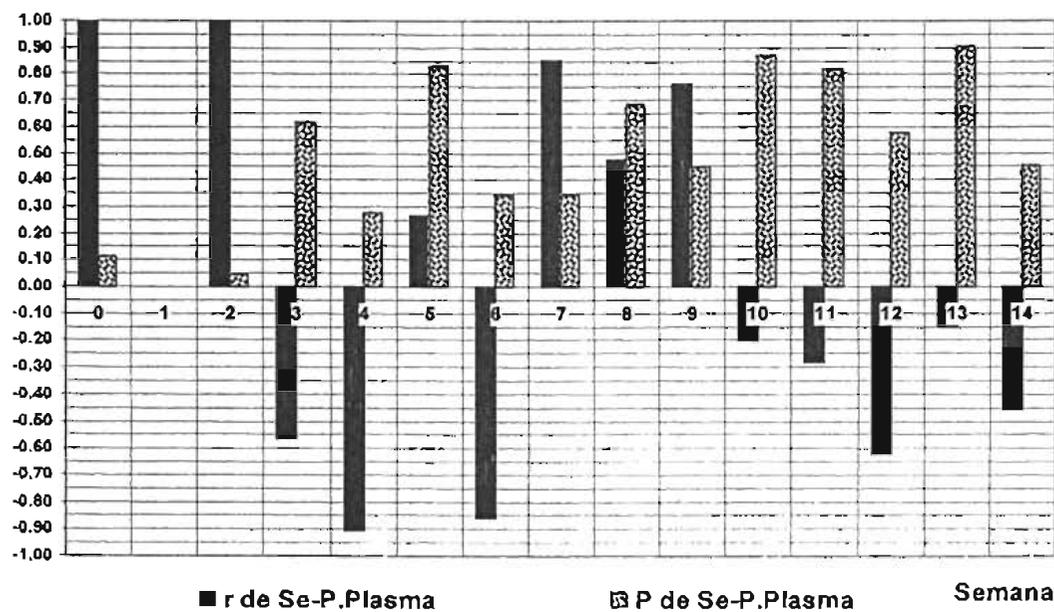


Figura 12. Correlación entre selenio y proteínas plasmáticas del Grupo Control B

### Se orgánico

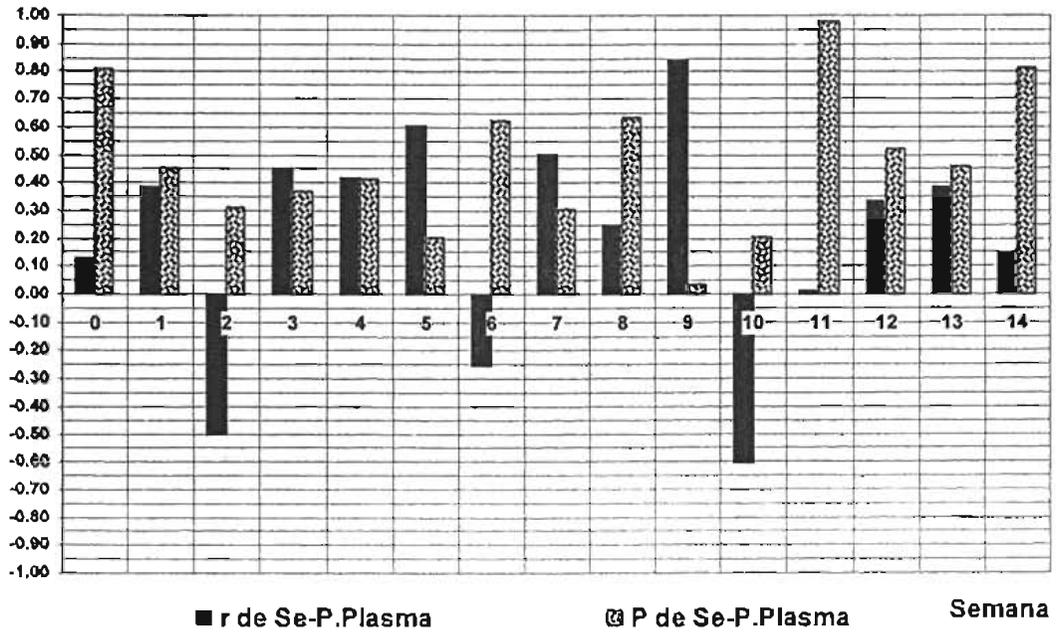


Figura 13. Correlación entre selenio y proteínas plasmáticas del Grupo selenio orgánico

### Se inorgánico

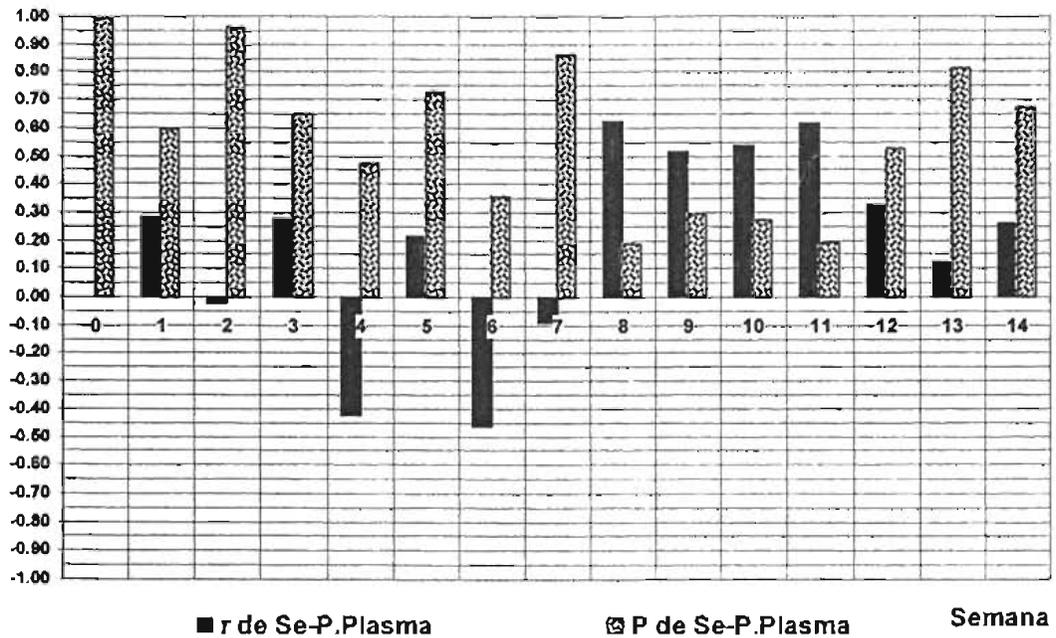


Figura 14. Correlación entre selenio y proteínas plasmáticas del Grupo selenio inorgánico

## 11. DISCUSIÓN

### 11.1. Concentración de selenio plasmático

#### 11.1.1. Efecto de la dosis suministrada a las unidades experimentales

La dosis suministrada vía bolos a las unidades experimentales (Cuadro 2) podría haber generado cuadros de toxicidad subaguda en caso de que la tasa de liberación de selenio hubiese excedido el equivalente a 2 mg/Kg, ya que ésta es considerada la dosis máxima tolerable en alimento para todas las especies (NRC, 1980). Además, es de considerar la aplicación de selenito de sodio por vía SC a las unidades experimentales, ya que se han reportado casos de toxicidad aguda cuando se suministraron 10 mg de selenito de sodio por cordero, por esta misma vía (Smith, 1999). Aun cuando se menciona una alta variabilidad en susceptibilidad en ovinos, se ha señalado que la LD<sub>50</sub> de selenito de sodio en corderos es de 1.9 mg/Kg de peso corporal, por vía oral, y de 0.455 mg/Kg por vía intramuscular. Se han reportado casos de intoxicación subaguda en ovinos que consumieron raciones que contenían de 10 a 20 mg/Kg por un periodo de siete a ocho semanas (Humphreys, 1988).

Sin embargo, considerando la información de la Figura 3, a lo largo del desarrollo del experimento ninguno de los grupos alcanzó concentraciones plasmáticas de selenio consideradas como tóxicas; esto es, estuvieron dentro del rango considerado como adecuado de 80 a 500 ng/g en plasma de ovinos (Puls, 1988). Una explicación para estos resultados observados puede deberse a que la tasa de liberación de los bolos de selenio orgánico e inorgánico fue lo suficientemente baja para no producir riesgos de toxicidad, aún con los antecedentes de su uso en animales no deficientes, con la aplicación de la dosis inyectada y cuadruplicando el número de bolos suministrados a las unidades experimentales. La tasa de liberación de selenio en los bolos depende de factores atribuibles a la misma formulación del bolo y a factores inherentes al microambiente ruminal. La proporción de cutina que contiene el bolo regula la velocidad de "disolución" de éste, y por tanto la cantidad de selenio que es

liberado en el medio ruminal. Así mismo, la “disolución” del bolo es afectada por las condiciones de acidez y temperatura que oscilan en el rumen. La acidez y la temperatura, a su vez, dependen de la dieta ingerida por el animal y la actividad de los microorganismos ruminales (Church, 1988). Los microorganismos ruminales tienen la capacidad de producir formas menos biodisponibles para el animal. Distintos autores han citado que los microorganismos ruminales tienen la capacidad de producir formas insolubles de selenio, las cuales no son absorbidas en el tracto digestivo (NRC, 1983). van Ryssen and Schoeder (2003) demostraron que la cantidad de selenio disponible para el ganado fue afectada por la fermentación ruminal. Gran parte del selenio que fue aportado por los bolos pudiese haber sido eliminado por vía fecal en formas insolubles. Aún así, se ha reportado que cuando se ha suministrado selenio orgánico por vía oral en “rumiantes”, éste ha mostrado tener mayor biodisponibilidad que las formas inorgánicas (McDowell *et al.*, 2002; Underwood, 1999). Este mismo resultado fue observado en el presente estudio, e incluso los mismos microorganismos ruminales podrían haber “regulado” la cantidad de selenio disponible para el animal, limitando de igual manera la posibilidad de llegar a tener concentraciones tóxicas.

Las concentraciones máximas observadas en el presente estudio correspondieron a los grupos tratados con bolos de liberación lenta, lo cual indica que hubo efecto de los tratamientos y, que a su vez, no se alcanzaron concentraciones tóxicas de selenio plasmático. La concentración media más alta observada correspondió al grupo de selenio orgánico, siendo de 335.52 ng/g, seguida a la observada del grupo de selenio inorgánico de 258.87 ng/g. Este resultado coincide con distintos reportes que señalan que la suplementación con fuentes de selenio orgánico tienen mayor biodisponibilidad que las fuentes de selenio inorgánico (McDowell, *et al.* 2002, Underwood, 1999, Ortman, y Pehrson, 1997 Wang y Lovell, 1997). Asimismo, es importante señalar que las concentraciones máximas alcanzadas disminuyeron rápidamente, lo cual se discutirá a continuación.

### 11.1.2. Tendencias de las concentraciones de selenio

En la Figura 3 se puede observar que los bolos suministrados a las unidades experimentales de los grupos de selenio orgánico e inorgánico demostraron su acción a partir de la primera semana, durando este efecto significativo hasta la quinta semana. Se esperaba que en este lapso de tiempo pudiese haber existido la posibilidad de encontrar concentraciones plasmáticas de selenio por arriba de lo tolerado (500 ng/g), ya que en estudios realizados previamente a estos bolos se demostró que el pico máximo de liberación de selenio se presentaba en este periodo.

Si bien las concentraciones plasmáticas de selenio no rebasaron los límites tolerables e incluso las diferencias significativas entre las fuentes de selenio orgánico e inorgánico sólo se apreciaron hasta la quinta semana, es importante considerar los resultados observados por Shiobara *et al.* (1998). Ellos observaron que cuando compararon las concentraciones de selenio en plasma y sangre, habiendo proporcionado dietas con dosis excesivas de selenito de sodio y selenometionina (2 µg/g) por un periodo de 12 semanas, las concentraciones de selenio sanguíneo de ratas suplementadas con selenometionina eran significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) que las ratas suplementadas con selenito de sodio, y que lo anterior no se observaba en el plasma. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Gerlof (1992) y Jiménez *et al.* (1998). Ellos observaron que las concentraciones de selenio plasmático pueden ser un indicador de cómo serán las concentraciones de selenio sanguíneo en el futuro próximo.

Entonces, las concentraciones de selenio plasmático observadas en este estudio tampoco representan un indicador de probable toxicidad en el futuro. El hecho de que los bolos de liberación lenta de selenolevaduras proporcionaron su máxima concentración de selenio entre la primera y quinta semana muestra que las concentraciones subsecuentes fueron asimiladas por el animal, sin mostrar diferencias plasmáticas de selenio con los grupos control.

La similitud de las tendencias de las concentraciones medias de selenio plasmático entre los grupos experimentales y el grupo no tratado (Control A) es un

aspecto que debe ser analizado, ya que se observan aumentos y disminuciones en los mismos tiempos. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos en sangre por Blanco *et al.* (1988) y Kendal *et al.* (2001). Es probable que esta similitud de tendencias corresponda a un comportamiento natural de las concentraciones plasmáticas de selenio en el animal. Se ha descrito que el selenuro es el punto de intersección en la ruta metabólica de las fuentes orgánicas e inorgánicas de selenio (Sunde, 1990); y que por tanto, independientemente del origen químico del selenio, la cantidad de selenio plasmático podría ser similar en los diferentes grupos del presente experimento. Sin embargo, también se ha observado que el metabolismo del selenio depende no sólo de la forma química que recibe el animal, si no que también de la dosis. Cuando las dosis de selenio no superan la capacidad que tiene el animal para asimilarlo, éste es incorporado a selenoproteínas, pero cuando las dosis son altas, entonces la ruta metabólica del selenio es la metilación para su posterior excreción (Suzuki *et al.*, 1995).

A lo anterior se le podría considerar un mecanismo de regulación y prevención de toxicidad por selenio. Este mecanismo de regulación puede ser la razón de que, aun cuando existen diferencias en la forma química y dosis suministrada a los animales, existen fluctuaciones similares entre los grupos control y experimentales.

## **11.2. Actividad de la enzima GSHPx**

### **11.2.1. Efecto de tratamientos sobre la actividad de la enzima**

Como se puede observar en la Figura 4, la actividad de la enzima tuvo un comportamiento variable en todos los grupos. La actividad de la GSHPx de los cuatro grupos se mantuvo dentro de los valores normales, considerados por Puls (1988), durante todo el tiempo que duró el estudio. Esto quiere decir que en ningún momento se observó un efecto asociado a la toxicidad por selenio. Se ha reportado que uno de los posibles mecanismos de toxicidad del selenio es que el selenio “agota” la actividad de la enzima GSHPx (Hoffman, 1977; EVM, 1999). Lo anterior puede ser explicado al observarse que las concentraciones máximas de

selenio en plasma fueron inferiores al las concentraciones reportadas como tóxicas, por lo que no tuvieron un efecto negativo en la actividad de la enzima.

#### 11.2.2. Tendencias de la actividad de la enzima

Al realizar contrastes ortogonales, considerando la actividad de la enzima y el tiempo, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.5$ ) entre grupos (Cuadro 10). En la Figura 4 se puede apreciar que el comportamiento de la enzima incrementaba y disminuía de manera fluctuante, a excepción del grupo de selenio orgánico; que aun cuando no existieron diferencias significativas, la actividad se puede observar con un comportamiento más "lineal o constante" a lo largo del experimento. Este comportamiento con menos fluctuaciones en la actividad coincide con el tiempo en que este grupo alcanzó las concentraciones más altas de selenio; esto es, de la primera a la quinta semana (Figuras 3 y 4). Esto puede deberse a que existen diferencias en las formas que el selenio es metabolizado en el organismo. Se sabe, por ejemplo, que el selenito de sodio puede ser más tóxico que el selenato de sodio debido a que este no es excretado inmediatamente por vía renal, debido a que éste es captado y conjugado en el hígado a una albúmina (Kobayashi *et al.*, 2001). El selenio orgánico, en sus formas de selenometionina o selenocisteína pueden ser incorporado a los tejidos de manera directa o ser transformado a selenuro, siguiendo una ruta similar a la de las fuentes inorgánicas (Sunde, 1990). La incorporación directa de los selenoaminoácidos a las proteínas podría ser el factor que explique la actividad menos variable de la enzima a lo largo del tiempo. Los animales suplementados con selenio orgánico cuentan con la reserva de selenio incorporado a las proteínas. El selenio no es solamente incorporado a las selenoproteínas, éste también es incorporado a proteínas generales, debido a que la selenometionina (SeMet) puede ser incorporada en lugar de la metionina (Beilstein and Whanger, 1992). Shiobara *et al.* observaron que ratas suplementadas con altas concentraciones de selenio orgánico mostraban altas concentraciones de SeMet en pelo, y que lo anterior no ocurría cuando se las concentraciones altas eran de selenito de sodio.

Lo anterior sugiere que los animales tratados con bolos de selenolevaduras podrían haber mantenido la actividad de la enzima sin las fluctuaciones observadas en los otros grupos debido a las “reservas” de selenio provistas por los selenoaminoácidos incorporados a selenoproteínas y proteínas generales. Se puede suponer que existe la posibilidad de que las concentraciones de selenio en animales que fueron suplementados con selenio orgánico puedan ser reguladas mediante la misma ruta metabólica del selenio, formándose selenocisteína a partir de selenometionina, vía selenuro o transulfuración (Sunde, 1990).

En la semana 9 se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) de la actividad de la enzima de los cuatro grupos con respecto a las semanas 1 a 13. Se descarta la posibilidad de que estos resultados puedan ser adjudicados a un error en el procesamiento de las muestras, ya que estas fueron procesadas en días diferentes, y aún así presentaron un comportamiento similar. Las respuestas observadas podrían ser atribuibles al comportamiento de la enzima. Se ha reportado variación temporal de la actividad de la enzima GSHPx en ovinos. Andrés *et al.* (1999) observaron que la actividad de la enzima tiene relación con las estaciones del año; diferenciando entre el periodo otoño-invierno y primavera-verano. La asociación que realizaron tiene que ver con la cantidad de cereales que recibe el ganado y la calidad del forraje. Por otra parte, en otro estudio realizado en tejidos de corazones y riñones de rata se observó que de manera cíclica, la actividad de la enzima GSHPx era mayor en verano (Belló-Klein *et al.*, 2000). Martín *et al.* (2003) realizaron estudios en hígados y riñones de ratones y observaron que la actividad de esta enzima varía dependiendo de la edad de los animales y la hora del día; específicamente, varía con la cantidad de luz. Por lo anterior, debe considerarse la posibilidad de que el comportamiento similar de las tendencias de la actividad de la enzima GSHPx en los cuatro grupos analizados en este estudio fue dependiente de los ciclos normales de variación de la enzima.

### 11.3. Concentración de proteínas plasmáticas

#### 11.3.1. Efecto de tratamientos sobre las concentraciones de proteínas plasmáticas

Al no haberse presentado concentraciones dañinas de selenio en los animales del estudio, no se presentaron alteraciones en la función hepática por lo que no se observaron diferencias significativas entre las medias de los grupos analizados (Figura 5 y Cuadro 13).

El objetivo de medir la concentración de proteínas plasmáticas era asociar su posible disminución a concentraciones altas de selenio, ya que como se ha observado en distintos estudios, las concentraciones tóxicas de selenio pueden dañar al hígado y/o alterar la función hepática (EVM, 1999). Entre los efectos bioquímicos que se mencionan están la elevación de enzimas como la alaninoaminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FAS); pero además, cuando los efectos dañinos del selenio involucran malfunción hepática, se ha visto que aumenta el tiempo de coagulación, aumenta el tiempo de protrombina, y disminuyen las proteínas plasmáticas (Baker, 1987; Jacobs and Forst, 198, citados en EVM, 1999; Yang, G. *et al.*, 1989, citado en SCF, 2000).

#### 11.3.1. Tendencias de las concentraciones de proteínas plasmáticas

Al analizar el gráfico de los perfiles de la concentración de proteínas plasmáticas se pudo observar que todos los grupos mostraron un comportamiento similar (Figura 5). Después de analizar los datos a través de contrastes ortogonales no se localizaron diferencias significativas entre grupos en los mismos momentos en que se realizaban las comparaciones, lo cual indica que en todo momento las concentraciones de proteínas plasmáticas fluctuaron sin deberse al efecto del tratamiento.

#### 11.4. Signos clínicos

Como se esperaba, no se presentaron signos clínicos asociados a toxicidad por selenio. En el planteamiento del estudio se comentó que los signos clínicos sólo se podrían haber presentado en el caso de que la concentración suministrada a las unidades experimentales no hubiese sido liberada lentamente, lo cual podría haber ocurrido en el caso de que los bolos se hubieran fragmentado por alguna causa mecánica, principalmente al momento de suministrarlos a los animales. La ausencia de signos clínicos de toxicosis se explica debido a que la dosis suministrada a las unidades experimentales a través de los 4 bolos de liberación lenta (8.33 mg de Se c/u) sumada a la inyección de selenito de sodio (0.1 mg/Kg PV) no significó un riesgo de toxicidad. El hecho de que no se rebasaron las concentraciones máximas tolerables (500 ng/g) en plasma explica el porque no se manifestaron signos asociados a la toxicidad por selenio.

Como fue contemplado, el mecanismo para identificar una probable toxicosis subaguda por selenio fue a través de la disminución de la actividad de la enzima GSHPx y la disminución de las proteínas plasmáticas.

#### 11.5. Peso

Se esperaba que en caso de presentarse problemas de toxicidad subclínica se manifestara retraso en la ganancia de peso, pero esto no fue así. Como se observó en la Figura 6, todos los grupos incrementaron su peso a lo largo del estudio sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Existen publicaciones, como la de Oblitas *et al.* (2000), que mencionan, incluso, ganancias significativas de peso cuando el ganado bovino fue inyectado con selenito de sodio a una dosis de 5 mg de Se/100 Kg de peso corporal. También existen publicaciones como las de Gabryszuk and Klewicz (2002) en donde no observaron diferencias en ganancia de peso en corderos retrasados, inyectados con 5 ml de selenato de sodio al 0.1%. Por lo anterior, la forma química y vía del tratamiento con selenio debe ser considerada en la ganancia de peso del ganado. Se debe resaltar que en este

estudio no se observaron diferencias significativas en ganancia de peso entre los tratamientos por vía oral de selenito de sodio y de selenolevaduras.

## **11.6. Relaciones entre respuestas medidas**

### **11.6.1. Selenio – Glutación peroxidasa**

En el presente estudio se obtuvieron resultados que no coinciden con investigaciones previas, que señalan haber encontrado una alta correlación entre las concentraciones de selenio plasmático con la actividad de la enzima GSHPx sanguínea y plasmática (Daun and Akesson, 2004; Oblitas *et al.*, 2000; Pavlata *et al.*, 2000; Andrés, 1996). Aunque se coincide con resultados de estudios realizados por Zagrodzki *et al.* (2000), en los que se señala no haber encontrado efectos significativos sobre la actividad de la enzima GSHPx citoplasmática cuando suplementaron con un producto a base de selenio orgánico. Awadeh *et al.* (1998) reportaron que cuando incorporaron dos fuentes diferentes de selenio en la dieta: selenito de sodio y selenolevaduras, no observaron diferencias significativas en la incorporación a selenoproteínas.

En el plasma existen varias selenoproteínas plasmáticas que han demostrado actividad antioxidante, entre las cuales destacan la GSHPx plasmática (eGSHPx) y la selenoproteína P (Behne and Kyriakopoulos, 2001; Arteel and Sie, 2001). La selenoproteína que se encuentra en mayor concentración en el plasma es la selenoproteína P. Las determinaciones de la concentración de selenio y la actividad de la enzima GSHPx fueron realizadas en plasma. Al parecer este fue un factor determinante para explicar la baja correlación observada en los resultados de este estudio. En estudios anteriores las correlaciones fueron realizadas con la actividad de la enzima en sangre completa; y aún cuando se ha reportado que la actividad de la enzima a nivel plasmático y sanguíneo tienen una alta correlación ( $r > 0.6$ ), también se ha señalado que la actividad de la enzima eGPx el 10 % en relación a la actividad de la enzima GSHPx citoplasmática (cGSHPx) (Pehrson *et al.*, 1999; Shiobara *et al.*, 1998).

Analizando lo que se reporta, se entiende que cuando las correlaciones se han hecho entre cGSHPx y selenito de sodio, éstas son altas; y que cuando dicha correlación de esta enzima es realizada con selenometionina, entonces ésta se observa baja. Y en el caso de la correlación entre eGSHPx ocurre un caso contrario.

Las correlaciones significativas observadas de las variables Se – GSHPx en todos los grupos fueron aisladas, no se puede hablar de una clara correlación en alguno de éstos. Con base en los resultados observados en el presente estudio se puede decir que los tratamientos empleados no influyeron de manera significativa sobre la actividad de la eGSHPx.

Aunque la mayoría de correlaciones de los cuatro grupos no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) a lo largo del estudio, se puede apreciar que la correlación directa e indirecta del grupo no tratado (Grupo Control A) y el grupo tratado con bolos de selenolevaduras (Grupo Se orgánico) fueron más similares entre sí (Figuras 7 y 9) que con los grupos que fueron tratados solamente con fuentes inorgánicas de selenio (Figuras 8 y 10). También es interesante señalar que existe coincidencia entre las semanas en que se presentaron las concentraciones más altas de selenio orgánico (Figura 3) y las correlaciones directas de Se-GSHPx (Figura 9). Debido a que las correlaciones no fueron significativas, no se puede asegurar que exista una asociación de las concentraciones elevadas de selenio en las primeras cinco semanas con un aumento de la actividad de la GSHPx.

Una explicación para la ausencia de correlación entre las concentraciones de selenio y la actividad de la GSHPx en los cuatro grupos es el hecho de que las concentraciones de selenio estuvieron dentro de los valores normales y, por lo tanto, la actividad de la enzima no se vio afectada de manera significativa.

Esta idea puede explicar la ausencia de correlación entre Se-GSHPx que se observó en este estudio, y de igual manera, se puede entender la razón de la falta de coincidencia con otros estudios en los que se ha realizado la correlación de estas variables. Por lo tanto, cuando se quiera realizar una comparación de la correlación entre Se y GSHPx, será importante tomar en cuenta si dicha

correlación se realiza con concentraciones deficientes, óptimas o tóxicas de selenio.

Otro factor que se ha considerado en esta correlación es el sexo. Existen estudios en ratones en los que se señala que se ha observado que los machos son más susceptibles a la toxicidad por selenito de sodio que las hembras (Jacobs and Forst, 1981; Schroeder and Mitchener, 1971).

Sin embargo, en el presente estudio se observó que el factor sexo no tuvo efecto sobre la concentración de selenio o la actividad de la GSHPx (ver Anexo V), por lo que fue descartado del modelo estadístico. Este resultado podría también estar asociado al hecho de que las concentraciones de selenio estuvieron, en todo momento, dentro de los valores normales.

#### 11.6.2. Selenio – Proteínas plasmáticas

Al igual que en el caso de la GSHPx, no se observó correlación entre los tratamientos empleados en el estudio y la concentración de proteínas plasmáticas (Figuras 11, 12, 13 y 14). Como se explicó anteriormente, se esperaba que se pudiese presentar correlación inversa entre Se-proteínas plasmáticas, pero no se observaron indicios de malfunción hepática asociada a toxicidad por selenio. Los casos en los que se presentaron correlaciones significativas fueron aislados, por lo que es correcto volver a señalar que una posible explicación de estos resultados fue el hecho de que, en ningún momento, las concentraciones de selenio alcanzaron niveles de toxicidad (por arriba de 500 ng/g), por lo que las concentraciones de selenio que recibieron los animales no afectaron la concentración de proteínas plasmáticas.

## 12. CONCLUSIONES

Existen diferencias en las concentraciones de selenio plasmático en ovinos después de haber sido tratados con bolos de liberación lenta de selenito de sodio y selenolevaduras. Se demostró que los bolos de selenolevaduras mantienen concentraciones de selenio plasmático más altas que las de selenito de sodio. Las diferencias sólo se pudieron apreciar en las primeras cinco semanas después de haber administrado los bolos de liberación lenta. Después de la sexta semana, no se observaron diferencias en las concentraciones de selenio con los animales no tratados, por lo que el dispositivo asegura ser efectivo sólo durante este periodo.

Ninguna de las concentraciones observada en este estudio se acercan a concentraciones de toxicidad, por lo que se concluye que los bolos de liberación lenta de selenolevaduras y de selenito de sodio con un contenido de 8.33 mg c/u que fueron probados en este trabajo no representan un riesgo de toxicidad para el ganado ovino.

Al no observarse concentraciones cercanas a los límites de toxicidad, no se pudo detectar ventajas en la disminución de riesgos intoxicación por selenio entre las dos formas químicas empleadas en este estudio.

Para poder conocer la dosificación máxima tolerable de selenio en bolos de liberación lenta para ovinos es necesario contar con selenolevaduras con una mayor concentración de selenio, y que de esta manera permitan incrementar la dosis total que se suministra al animal. Mediante este procedimiento se podría contar con un dispositivo que cubriera las necesidades de selenio por un periodo mayor al observado en este estudio.

En este estudio no se observó correlación entre las formas orgánicas e inorgánicas de suplementación (selenito de sodio y selenolevaduras) con la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y proteínas plasmáticas.

Se sugiere que para detectar el efecto de la forma química en que se suplementa el selenio sobre la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y la concentración de proteínas plasmáticas es necesario realizar experimentos en los que se contemplen concentraciones deficientes, óptimas y tóxicas de selenio en la dieta.

Se sugiere que para poder identificar si existen ventajas en la disminución de riesgos de toxicidad, empleando selenolevaduras y selenito de sodio, es necesario realizar la medición de las concentraciones de selenio y actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma y sangre completa.

## LITERATURA CITADA

- Aburto, E.; Cribb, A.; Fuentealba, C.; Ikede, B.; Kinbenge, F.; Markham, F. 2001a. The failure of selenium supplementation to prevent cooper-induced liver damage in Fischer 344 rats. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 65: 104-110.
- Aburto, E.; Cribb, A.; Fuentealba. 2001b. Effect of chronic exposure to excess dietary cooper and dietary selenium supplementation on liver specimens from rats. *AJVR*, 62: 1423-1427.
- Allan, C.B.; Lacourciere, G.M. and Stadkman, T.C. 1999. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu.Rev. Nutr.*, 19: 1-16.
- Andersen, O. and Nielsen, J.B. 1994. Effects of simultaneous low-level dietary supplementation with inorganic and organic selenium on whole-body, blood, and organ levels of toxic metals in mice, *Environmental Health Perspectives*, 102: 321-324.
- Andrés, S. Mañé, M.; Sánchez, J. ; Barrera, R. ; Jiménez, A. 1999. Temporal variations in blood glutathione peroxidase (GSHP<sub>x</sub>) activity in sheep at pasture in a Mediterranean area, *The Veterinary Journal*, 157: 186-188.
- Andrés, S.; Mañé, M.; Sánchez, J. ; Barrera, R. ; Jiménez, A. 1996. Changes in GSHP<sub>x</sub> and muscle enzyme activities in lambs with myodegeneration following a single treatment with sodium selenite. *Small Ruminant Research*, 23: 183-186.
- Anzola, H. J. 2001. Algunas descripciones de la actividad biológica y fisiológica del selenio, [http://www.encolombia.com/acovez24284\\_organico.htm](http://www.encolombia.com/acovez24284_organico.htm)
- Arteel, G.E. and Sie, H. 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 153-158.
- Awadeh, F.T.; Abdelrahman, M.M.; Kincaid, R.L. and Finley, J.W. 1998. Effect of selenium supplements on the distribution of selenium among serum proteins in cattle. *J. Dairy. Sci.*, 81 : 1089-1094.
- Baker, D.; James, L.; Panter, K.; Mayland, H. and Pfister, J. En International Symposium on Trace Elements in Man and Animals. 1987. *Plenum*, pp. 701-703.
- Baruthio, F. 1997. Assurance de qualité de l'a analyse des éléments trace en biologie, *Technique & documentation - Lavoisier*, Paris, 216p.
- Behne, D and Kyriakopoulos, A. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.*, 21: 453-473.
- Behne, D.; Kyriakopoulos, A.; Scheid, S.; Gessner, H. 1991. Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue protein rats. *J. Nutr*, 121(6): 806-814.
- Beilstein, M.A. and Whanger, P.D. 1992. Selenium metabolism and glutathione peroxidase activity in culture human lymphoblasts. Effects of transsulfuration defects and pyridoxal phosphate. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 35: 105-118.

- Belló-Klein, A.; Morgan-Martins, M.I.; Barp, J.; Llesuy, S.; Belló, A.A.; Singal, P.K. 2000. Circaannual changes in antioxidants and oxidative stress in the heart and liver in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 126: 203-208.
- Blanco, M.A.; Spross, A.K.; Rosiles, R. 2000. Evaluación de comprimidos intrarruminales por concentración sanguínea y lanar en corderas semiestabuladas. *Veterinaria*, 31(2): 121-127.
- Buck, W; Osweiler, G; Van Gelder, A.1981. Toxicología veterinaria clínica y diagnóstica, *Acribia*, España, pp. 434-445.
- Church, D.C. 1988. The Ruminant Animal: Digestive physiology and nutrition. *Prentice Hall*, New Jersey, USA, 564p.
- Daun, C. and Akesson, B. 2004a. Comparison of glutathione peroxidase activity, and of total and soluble content in two muscles from chicken, turkey, duck, ostrich and lamb. *Food Chemistry*, 85: 295-303.
- Daun, C. and Akesson, B. 2004b. Glutathione peroxidase activity and content of total and soluble selenium in five bovine and porcine organs used in meat production. *Meat Science*, 66: 801-807.
- Daun, C.; Johansson, M.; Önnings, G.; and Akesson, B. 2001. Glutathione peroxidase activity, tissue and soluble selenium content in beef and pork in relation to meat ageing and pig RN phenotype. *Food Chemistry*, 73: 313-319.
- Draft Toxicological Profile for Selenium. U.S Department of Health and Human Services, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*: 1-386, 2001.
- EMA. 1999. Barium selenate. *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Veterinary Medicines Evaluation Unit*, EMA/MLR/580/99/-Final, 6p.
- EVM: Expert group on vitamins and minerals. 1999. Review of selenium. *Expert Group on Vitamins and Minerals Secretariat*, Covering note: 53 p.
- EVM: Expert group on vitamins and minerals. 2003. Safe Upper Limits for Vitamins and Minerals. *Expert Group on Vitamins and Minerals Secretariat*, 360 p.
- Flohe, L. and Günzler, W.A. 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105: 114-121.
- Food and Drug Administration.1989. Target Safety Guidelines for New Animal Drugs. *Office of New Animal Evaluation*, <http://fda.gov/cvm/guidance/guideline33.html#thr>.
- Gabryszuk, M. and Klewicz, J. 2002. Effect of injecting 2- and 3-year-old ewes with selenium and selenium vitamin E on reproduction and rearing lambs. *Small Ruminant Research*, 43: 127-132.
- Gamble, S.; Wiseman, A. and Goldfarb, P. 1997. Selenium-dependent peroxidase and other selenoproteins: Their synthesis and biochemical roles. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 68: 123-134.
- Gartenberg, P.K.; McDowell, L.R.; Rodríguez, D.; Wilkinson, N.; Conrad, J.H. and Martin, G. 1990. Evaluation of trace mineral status in ruminants in northeast

Mexico. *Livestock Research for Rural Development*,  
<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd2/1/mcdowell.htm>

- Gerlof, B.J. 1992. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J. Anim. Sci.*, 70: 3934-3940.
- Gyurasics, A.; Perjesit, P. and Gregus, Z. 1998. Role of glutathione and methylation in the biliary excretion of selenium: The paradoxical effect of sulfobrothphthalein. *Biochemical Pharmacology*, 56: 1381-1389.
- Hayes, A. W. 1989. Principles and Methods of Toxicology. *Raven Press*, New York.
- Health consultation. 2001. selenium,  
[http://atsdr.cdc.gov/HAC/PHA/marshall/mar\\_p2.html](http://atsdr.cdc.gov/HAC/PHA/marshall/mar_p2.html).
- Hemingway, R.G; Parkins, J.J; Ritchie, N.S. 2001. Enhanced reproductive performance of ewes given a sustained-release multi-trace element/vitamin ruminal bolus. *Small Ruminant Research*, 39: 25-30.
- Himeno, S. and Imura, N. 2000. New aspects of physiological and pharmacological roles of selenium, *Journal of Health Science*, 46(6): 393-398.
- Hoffman, J.L. 1977. Selenite toxicity, depletion of liver S-adenosylmethionine, and inactivation of methionine adenosyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 179: 136-140.
- Humphreys, D. J. 1988. Veterinary toxicology, *Baiee Tindal*, London, pp 74-77.
- Jacobs, M. and Forst, C. 1981. Toxicological effect of sodium selenite in Swiss mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 8: 587-598.
- Jiménez, A.; Andrés, S.; Mañé, M.; Sánchez, J.; Barrera, R.; Benito, M. 1998. Evaluation of different prophylactic methods against selenium deficiency in sheep grazing on range in Southwestern Spain, *Small Ruminant Research*, 29: 193-199.
- Judson, G.H; Ellis, N,F. 1991. Long-acting selenium treatment for sheep. *Aust. Vet. J.*, 68: 263-265.
- Kendall, N.R.; Mackenzie, A.M.; Telfer, S.B. 2001. Effect of a copper, cobalt and selenium bolus given to grazing sheep. *Livestock Production Science*, 68: 31-39.
- Kobayashi, Y.; Ogra, Y. and Suzuki, K.; 2001. Speciation and metabolism of selenium injected with <sup>82</sup>Se-enriched selenite and selenate in rats. *Journal of Chromatography B*, 760: 73-81.
- Köhrle, J.1999. The trace element selenium and the thyroid gland, *Biochimie*, 81: 527-533.
- Korac, B. and Buzadzic, B. 2002. Selenium Supplementation and GSH-Px activity in the IBAT and erythrocytes of cold-adapted rats, *Food Research International*, 35: 221-224.
- Kuchel, R.E. and Buckley, R.A. 1969. The provision of Se to sheep by means of heavy pellets. *Aust. J. Agric. Res.*, 2001: 1009-1107. (en Olfield, 2002).

- Lawrence, R.A. and Burk, R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 952-958.
- Lee, J.; Knowles, S.O. and Judson, G.J. 2002. Trace-element and vitamin nutrition of grazing sheep. *CAB International*, pp. 285-310.
- Levander, O.A. 1987. A global view of human selenium nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, 7:220-250. (en 36)
- Licata, P. *et al.* 2004. Levels of "toxic" and "essential" metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environment International*, 30: 1-6.
- Martin, C. *et al.* 2003. Effect of age and photoperiodic conditions on metabolism and oxidative stress related markers at different circadian stages in rat liver and kidney. *Life Sciences*, 73: 327-335.
- McDowell, L.R.; Valle, G; Cristaldi, L; Davis, P; Rosendo, O and Wilkinson, S. 2002. Selenium availability and methods of selenium supplementation for grazing ruminants. Proceeding 13<sup>th</sup> Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp 86-102.
- Moxon, A.L. 1937. Alkali disease, or selenium poisoning disease bull. 331. South Dakota Agric. Exp. Sta. Brookings (Citado en Olfield,2002.)
- NRC. 1980. Mineral tolerance of domestic animals, Subcommittee on mineral toxicity in animals, *National Academy of Sciences*, Washington, D.C.
- NRC. 1983. Selenium in Nutrition, *National Academy Press*, Washington, D.C.
- Nutrición mineral de rumiantes en pastoreo. Información no publicada.
- Oblitas, F.; Contreras, P.A.; Böhmwald, H.; Wittwer, F. 2000. Effect of selenium supplementation on blood glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and weight gain in heifers. *Arch. Med. Vet.* 32: 1-12.
- Olfield, J.E. 2002. A brief history of selenium research: From alkali disease to prostate cancer prevention (from poison to prevention). *American Society of Animal Science*, Oregon State University, Corvallis 97331, 4p.
- Ortman, K. y Pehrson, B. 1997. Selenite and selenium yeast feed supplements for dairy cows. *J. Vet. Med.* 44: 373-380.
- Paglia, D. and Valentine, W. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab & Clin. Med.*, 70: 158-169.
- Palmer I. S. 2001. Toxicity Studies in South Dakota, [http://ohioline.osu.edu/sc167/sc167\\_03.html](http://ohioline.osu.edu/sc167/sc167_03.html).
- Pavlatá, L; Pechová, A; and Illek, J. 2000. Direct and indirect assessment of selenium status in cattle – a comparison, *Acta Vet. Brno*, 69: 281-287.
- Pehrson, B.; Ortman, N.; Madjid, N. and Trafikowska, U. 1999. The Influence of dietary 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*, 77: 3371-3376.

- Plutchik, R. 1975. Fundamentos de investigación experimental, segunda edición, *Harla*, 296p.
- Puls, R. 1988. Mineral Levels in Animal Health: Diagnostic Data. *Sharpa International*, 153p.
- Ramírez-Bribiesca, J.E.; Hernández, E.; Hernández, L.; Tortora, J. 2004. Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sodio en la mortalidad de corderos y los valores hemáticos de selenio. *Agrociencia*, 38: 43-51.
- Ramírez-Bribiesca, J.E.; Tórtora, J.L.; Hernández, L.M.; Huerta, M. 2001a. Main causes of mortalities in dairy goat kids from the Mexican plateau. *Small Ruminant Research*, 41, 77-80.
- Ramírez-Bribiesca, J.E.; Tórtora, J.L.; Huerta, M.; Aguirre, A.; Hernández, L.M. 2001b. Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau. *Small Ruminant Research*, 41, 81-85.
- SAS. 1996. System for Mixed Models. *SAS Institute Inc.*, Cary, NC, USA. 633p.
- SCF: Scientific Committee on food. 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium. *European Commission*, Brussels – Belgium, 18p.
- Schroeder, H.A. and Mitchener, M. 1971. Selenium and tellurium in rats: Effects on growth, survival and tumors. *Journal of Nutrition*, 101: 1531-1540.
- Selenio Orgánico. 2001. [http://www.encolombia.com/acovez24284\\_organico.htm](http://www.encolombia.com/acovez24284_organico.htm).
- Selenio y Ganado. 2001. <http://ansci.correl.ecl/plants/toxicagents/selenium/selenium.html>.
- Shiobara, Y.; Yoshida, T. and Suzuki, K.Z. 1998. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood and urine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 152: 309-314.
- Smith, B.I.; Donovan, A.; Roae, D. 1999. Selenium toxicosis in a flock of Katahdin hair sheep. *Can Vet J.* 40: 192-194.
- Spalohlz, J. 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity, *Biol. Med.*, 17: 45-64.
- Sunde, R.A. 1990. Molecular biology of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.*, 10: 451-474.
- Suzuki, K.T.; Itoh, M. and Ohmichi, M. 1995. Selenium distribution and metabolic profile in relation to nutritional selenium status in rats. *Toxicology*, 103: 157-165.
- Swanson, I. V. 1989. Interactions of nutrition and reproduction. Discussion. *J. Dairy Sci.* 72: 805-814.
- Tinggi, U. 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review, *Toxicology Letters*, 137: 103-110.
- Ullrey, D. E. 1992. Basis for regulation of selenium supplements in animal diets, *J. Anim. Sci.* 70: 3922-3927.

- Ullrey, D. E.; Bradly, P. S.; Whitter, K. 1977. Selenium supplementation of diets for sheep and beef cattle. *J. Anim. Sci.* 45: 559.
- Underwood, E.J. 1999. The mineral nutrition of livestock, *Commonwealth Agricultural Bureaux*, London, U. K., pp 1-16. <http://www.cabi-publishing.org/pdf/Books/0851991289/1289ch1.pdf>
- Vadeland, SC; Deagen, JT; Whanger PD. 1992. Uptake of selenotrisulfides of glutathione and cysteine by brush border membranes from rat intestines, *J. Inorg. Biochem*, 47: 131-140.
- van Ryssen, J.B. and Schroeder, G.E. 2003. Effect of heat processing of protein sources on the disappearance of their selenium from mobile bags in the digestive tract of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 107: 15-27.
- Vandame, T.F. and Ellis, K.J. 2004. Issues in developing ruminal drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 1415-1436.
- VICH: International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. 2004. Studies to evaluate the safety of veterinary drugs in human food: Repeat-dose chronic toxicity testing. *IFAH*, Bruxelles, Belgium. <http://www.fda.gov/cvm/vich.html>
- Wang, C. and Lovell, R. T. 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 152: 223-234.
- Werner, G. 1988. Los suelos en el Estado de Tlaxcala. Gobierno del Estado de Tlaxcala, *Universidad Autónoma de Tlaxcala*, p. 198.
- Willson, R.L. 1987. Vitamin, selenium, zinc and copper interaction in free radical protection against ill-placed iron, *Proc. Nutr. Soc.* 46: 27-34.
- Yang, G. *et al.* 1989. Studies of safe maximal daily selenium intake in seleniferous area in China. Part II, *Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, 3: 123-130.
- Zagrodzki, P. *et al.* 2000. Selenoenzymes in animal tissues after supplementation with Selol, *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 44: 215-220.

## ANEXOS

### Anexo I: Detalles de las unidades experimentales

El peso de los animales osciló entre los 21.0 y los 46.0 kilogramos. La edad observada estuvo entre los 145 y los 204 días de nacidos

Los animales fueron distribuidos en forma aleatoria, teniendo cuatro grupos con las siguientes características al inicio del experimento:

Grupo	Sexo	Peso Kg	Edad Días
Control A	H	32.0	169
	H	27.5	152
	M	37.0	152
Control B	H	31.0	150
	M	25.0	149
	M	34.0	145
Se Orgánico	H	35.0	153
	H	34.0	164
	H	36.0	164
	M	46.0	155
	M	27.0	154
Se Inorgánico	M	31.5	162
	H	39.0	162
	H	26.0	161
	H	27.5	157
	M	21.0	157
M	27.0	151	
M	27.5	204	

**ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA**

## Anexo II: Descripción de métodos de cuantificación

### Glutación peroxidasa en plasma

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

#### *Buffer de fosfatos pH 7.0*

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

REACTIVO	FÓRMULA	PM	1 L
Fosfato de potasio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136.1	5.4250 g
Fosfato de potasio dibásico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	174.2	14.8375 g
EDTA 5.5 mM	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372.2	1.6300 g
Azida de sodio 4.7 mM	$\text{NaN}_3$	65.01	0.3050 g

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

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

#### *Peroxido de hidrógeno*

Cada día de las determinaciones se diluyeron 33  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % en un volumen aforado de 200 ml de agua desionizada. Esta dilución fue mantenida en el mismo matraz a temperatura ambiente durante las determinaciones.

### Mezcla de reacción

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

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

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

### Procedimiento

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

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

Para cada muestra se preparó un blanco de reactivos siguiendo estos pasos:

	<u>Blanco</u>	<u>Muestra</u>
Buffer de fosfatos	100 µl	50 µl
Muestra	—	50 µl
Mezcla de reacción	800 µl	800 µl
Reposo	8 min.	8 min.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl	100 µl
Agitar e introducir celda al espectrofotómetro		
Lectura (absorbancia inicial)	15 seg.	15 seg.
Lectura (absorbancia final)	5 min.	5 min.

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

### Cálculos

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

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

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

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

### Proteínas plasmáticas

Las proteínas plasmáticas fueron determinadas empleando el método de *Biuret*. En la metodología que proporciona el *Kit* del fabricante se recomienda realizar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Sin embargo, después de realizar una prueba de barrido el pico máximo observado se ubicó a 545 nm, por lo que se procedió a utilizar este resultado.

### Procedimiento

El espectrofotómetro UV-visible fue encendido hasta su estabilización por un tiempo de 30 min., seleccionando una longitud de onda de 545 nm. De igual manera, se encendió el baño maría hasta que la temperatura fue estabilizada a 37 °C. Posteriormente se prepararon las muestras, blanco de reactivos y estándar de prueba de la siguiente manera:

	BLANCO	ESTÁNDAR	MUESTRA
Reactivo de Biuret	1 ml	1 ml	1 ml
Agua destilada	20 µl	-----	-----
Estándar	-----	20 µl	-----
Muestra	-----	-----	20 µl

Posteriormente, cada una de las preparaciones fueron agitadas y colocadas en baño maría a 37°C durante 10 minutos. El espectrofotómetro fue ajustado acero colocando dos blancos de reactivos en las celdas de cuarzo del equipo, posteriormente se leyeron los estándares de prueba y las muestras.

Se prepararon tres estándares de prueba para cada 18 muestras (todas las muestras de un día de muestreo). El promedio de las lecturas de las absorbancias de los estándares de prueba fue tomado para realizar los siguientes cálculos:

### Cálculos

La concentración de proteínas totales en plasma fue obtenida empleando esta fórmula:

$$\text{g/ml de proteínas} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia estándar}} * \text{Valor del estándar (8 g / ml)}$$

### Selenio plasmático

Para la determinación de selenio plasmático fue necesario someter la muestra a un proceso de mineralización, el cual fue realizado al someter la muestra a una digestión ácida en horno de microondas. Después de este proceso se cuantificó la concentración de selenio en plasma. Todo el material que tuvo contacto con la muestra fue lavado con ácido nítrico al 10 % y enjuagado con agua desionizada.

#### *Digestión de la muestra*

Se pesó un gramo de muestra colocando un vaso de teflón para digestión en horno de microondas. Después de pesar, a la muestra se le agregaron 10 ml de H<sub>2</sub>O desionizada, 5 ml de HNO<sub>3</sub> y 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se dejó en reposo por 30 minutos. Al transcurrir este tiempo la muestra fue sometida a digestión. Se utilizaron los 14 sistemas (vasos de digestión) con que contaba el horno de microondas, y el método empleado consistió de dos pasos con una duración total de 17 minutos. El método fue controlado a través de la temperatura, y los pasos fueron los siguientes:

Paso	Rampa	Temperatura	Presión	Mantenimiento	Potencia
1	5 min.	120 °C	---	2 min.	1200 Wts
2	5 min.	170 °C	---	5 min.	1200 Wts

Después de dejar enfriar los sistemas, las muestras digeridas fueron recuperadas y aforadas en matraces de 50 ml con HCl 7M. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en envases de plástico con retapa y tapa de rosca, fueron identificadas, y fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta su lectura.

### *Cuantificación en Absorción Atómica por Generación de Hidruros*

Para la generación de hidruros se utilizó HCl 7M y una solución de NaBH<sub>4</sub> 0.6 % y NaOH al 0.5 %. En todo momento se utilizó HCl 7M como blanco y solución de enjuague entre cada una de las lecturas.

Se preparó una curva de calibración con cinco puntos: de 1 a 5 ppb; empleando, de igual manera, HCl 7M para su preparación.

El espectrofotómetro de absorción atómica fue ajustado con los siguientes parámetros:

Longitud de onda	196.0 nm
Amplitud de <i>Slit</i>	1.0 nm
Corriente de lámpara	10.0 mA

Los parámetros de medición fueron los siguientes:

Modo de calibración	Concentración
Modo de medición	Integrado
Réplicas del estándar	20
Réplicas de la muestra	5
Tiempo de medición	5 seg.

Los parámetros de la flama fueron los siguientes:

Tipo	Aire / Acetileno
Flujo de aire	13.50 L/min.
Flujo de acetileno	2.10 L/min.
Altura del quemador	6.2 mm

### *Cálculos*

El espectrofotómetro de absorción atómica proporcionó la concentración de la muestra aforada a 50 ml por lo que se utilizó la siguiente operación para conocer la concentración de selenio por gramo de muestra:

$$\text{ng/g Se} = \frac{\text{Concentración de muestra aforada (ng / g)} * 50}{\text{peso de la muestra}}$$

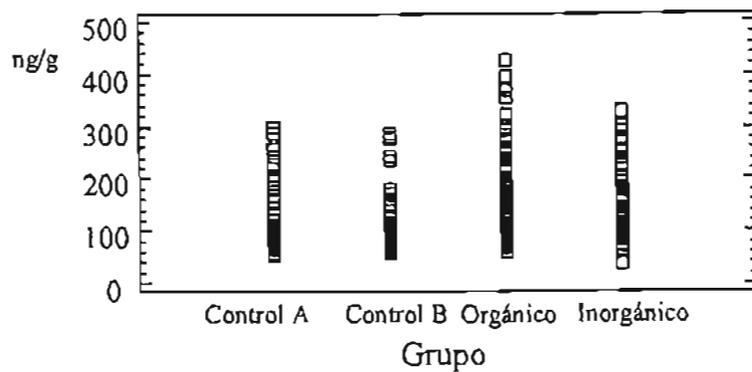
### Signos clínicos

Se realizó permanentemente la exploración de los animales en busca de signos clínicos que se reportan en casos de intoxicación por selenio (Back *et al.*, 1981; Humkpreys, 1988; NRC, 1983), los cuales son:

- Inapetencia
- Apatía ( o cambios de conducta)
- Pérdida de peso
- Deformación de pezuñas
- Aliento con olor a ajo
- Diarreas

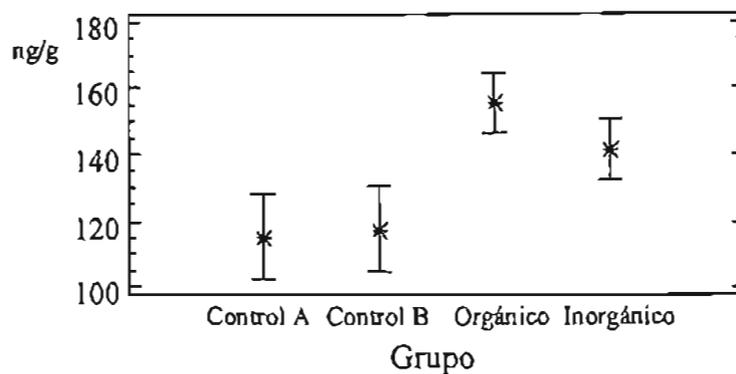
### Anexo III: Medias de las respuestas medidas

Selenio



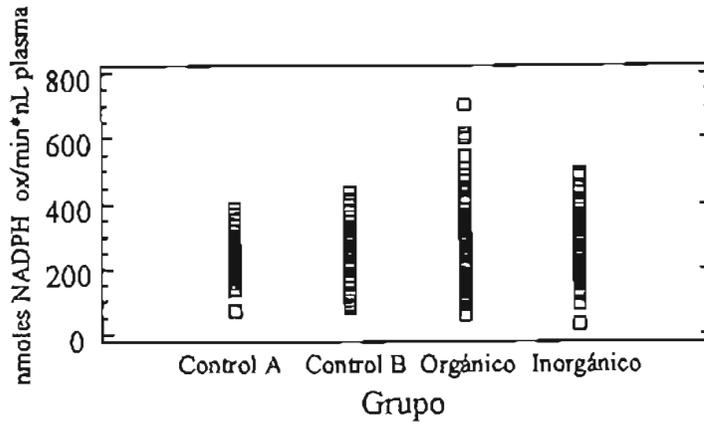
D

dispersión de resultados de Se plasmático por grupo

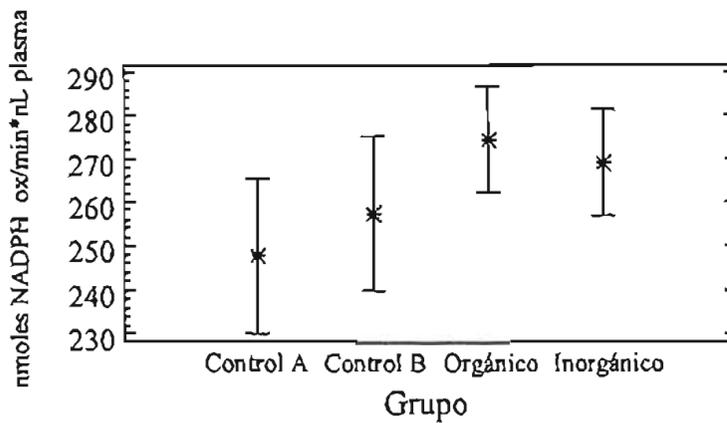


Medias e intervalos de diferencias mínimas significativas al 95% de selenio plasmático

## Glutación peroxidasa

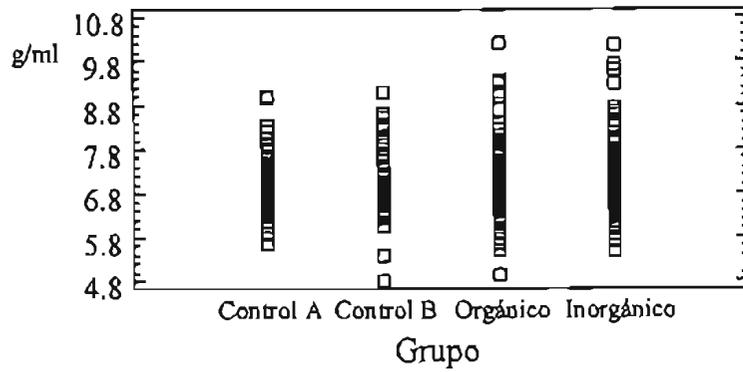


Dispersión de resultados de la enzima glutación peroxidasa (GSHPx)

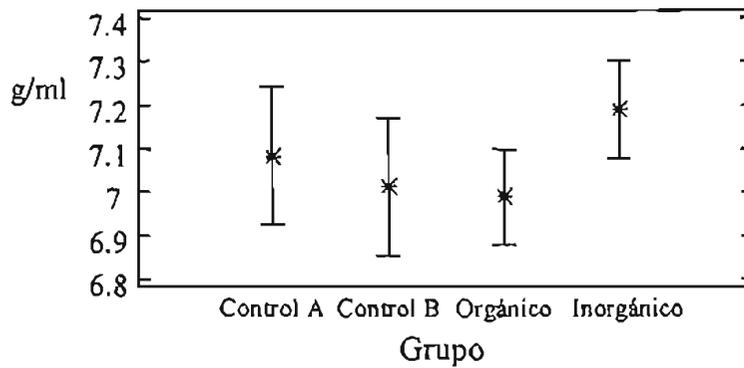


Medias e intervalos de diferencias mínimas significativas al 95% de la actividad de la enzima glutación peroxidasa (GSHPx)

Proteínas plasmáticas



Dispersión de las concentraciones de proteínas plasmáticas por grupos



Me

días e intervalos de diferencias mínimas significativas al 95% de proteínas

# Anexo IV: Resultados analizados

The SAS System

1695

Obs	ANIM	SEXO	EDAD	PESO	INICIAL	GRUPO	FECHA	SEMANA	Se	GSHPx	PPL ASMTICAS
1	371	H	169	40.0	40.0	1	01/08/20	0	115.32	301.605	5.6840
2	709	M	152	26.0	26.0	2	01/08/20	0	96.17	231.509	6.8259
3	713	M	152	21.0	21.0	4	01/08/20	0	130.04	192.281	7.0160
4	715	M	150	46.0	46.0	3	01/08/20	0	142.93	208.358	7.1919
5	717	M	149	37.5	37.5	1	01/08/20	0	76.80	225.078	7.1495
6	721	M	145	29.0	29.0	3	01/08/20	0	58.72	187.136	7.2935
7	723	M	153	34.5	34.5	2	01/08/20	0	62.64	153.696	6.5582
8	725	M	164	31.5	31.5	3	01/08/20	0	72.38	178.776	6.7260
9	726	H	164	32.0	32.0	1	01/08/20	0	79.10	203.213	6.0483
10	728	H	155	36.0	36.0	3	01/08/20	0	79.51	207.715	5.5366
11	730	H	154	34.5	34.5	3	01/08/20	0	90.69	196.139	5.7366
12	732	H	162	26.5	26.5	4	01/08/20	0	113.10	160.770	6.7870
13	734	H	162	31.0	31.0	2	01/08/20	0	107.15	262.377	7.0123
14	738	H	161	28.5	28.5	4	01/08/20	0	108.47	200.641	6.4532
15	876	M	157	26.0	26.0	4	01/08/20	0	154.54	149.838	6.2770
16	878	H	157	30.0	30.0	1	01/08/20	0	103.40	156.268	6.4939
17	879	H	151	38.0	38.0	3	01/08/20	0	98.22	300.961	6.0809
18	880	M	204	30.0	30.0	4	01/08/20	0	126.10	223.149	5.7382
19	371	M	169	40.0	40.0	4	04/08/20	1	194.35	229.580	7.0665
20	713	M	152	21.0	21.0	4	04/08/20	1	144.51	225.721	6.1669
21	715	M	150	46.0	46.0	3	04/08/20	1	142.19	230.866	5.6705
22	717	M	149	37.5	37.5	1	04/08/20	1	107.67	275.238	5.8721
23	721	M	145	29.0	29.0	3	04/08/20	1	258.45	260.447	6.8795
24	723	M	153	34.5	34.5	2	04/08/20	1	154.79	300.961	5.3808
25	725	M	164	31.5	31.5	3	04/08/20	1	425.24	284.884	6.5682
26	726	H	164	32.0	32.0	1	04/08/20	1	95.03	244.370	6.6231
27	728	H	155	36.0	36.0	3	04/08/20	1	202.73	264.949	6.5465
28	730	H	154	34.5	34.5	3	04/08/20	1	217.84	303.534	4.9216
29	732	H	162	26.5	26.5	4	04/08/20	1	142.10	200.641	6.8645
30	734	H	162	31.0	31.0	2	04/08/20	1	67.12	305.462	6.5448
31	738	H	161	28.5	28.5	4	04/08/20	1	138.55	241.155	6.6164
32	876	M	157	26.0	26.0	4	04/08/20	1	138.66	189.709	7.0327
33	878	H	157	30.0	30.0	1	04/08/20	1	70.21	192.281	7.1026
34	879	H	151	38.0	38.0	3	04/08/20	1	188.47	219.290	6.3719
35	880	M	204	30.0	30.0	4	04/08/20	1	143.81	234.081	7.2160
36	371	H	169	40.0	40.0	4	08/08/20	2	127.61	391.636	6.2235
37	709	M	152	26.0	26.0	2	08/08/20	2	162.47	243.727	6.4233
38	713	M	152	21.0	21.0	4	08/08/20	2	169.03	364.626	6.4400
39	715	M	150	46.0	46.0	3	08/08/20	2	123.05	316.395	7.1009
40	717	M	149	37.5	37.5	1	08/08/20	2	243.30	275.881	6.7561
41	721	M	145	29.0	29.0	3	08/08/20	2	178.81	327.971	6.2518
42	723	M	153	34.5	34.5	2	08/08/20	2	243.25	271.380	6.6098
43	725	M	164	31.5	31.5	3	08/08/20	2	257.03	349.836	6.0837
44	726	H	164	32.0	32.0	1	08/08/20	2	140.67	212.216	6.1667
45	728	H	155	36.0	36.0	3	08/08/20	2	245.10	251.444	6.1436
46	730	H	154	34.5	34.5	3	08/08/20	2	199.05	180.062	6.2651
47	732	H	162	26.5	26.5	4	08/08/20	2	130.51	203.213	6.8029
48	734	H	162	31.0	31.0	2	08/08/20	2	93.58	253.374	6.2984
49	738	H	161	28.5	28.5	4	08/08/20	2	141.64	237.297	6.7996
50	876	M	157	26.0	26.0	4	08/08/20	2	200.28	244.370	6.5049
51	878	H	157	30.0	30.0	1	08/08/20	2	135.84	298.389	6.5532
52	879	H	151	38.0	38.0	3	08/08/20	2	240.01	453.371	7.0130
53	880	M	204	30.0	30.0	4	08/08/20	2	179.58	228.293	6.7080
54	371	M	169	40.0	40.0	4	15/08/20	3	162.97	446.298	7.6516
55	709	M	152	26.0	26.0	2	15/08/20	3	89.90	334.402	7.6448
56	715	M	150	46.0	46.0	3	15/08/20	3	394.56	305.463	8.7053
57	721	M	145	29.0	29.0	3	15/08/20	3	352.73	302.891	7.2274
58	723	M	153	34.5	34.5	2	15/08/20	3	286.11	408.999	7.2085
59	725	M	164	31.5	31.5	3	15/08/20	3	323.13	294.531	6.3583
60	726	H	164	32.0	32.0	1	15/08/20	3	257.11	282.312	6.6790
61	728	H	155	36.0	36.0	3	15/08/20	3	250.38	362.697	7.1860
62	730	H	154	34.5	34.5	3	15/08/20	3	322.33	286.171	6.7135
63	732	H	162	26.5	26.5	4	15/08/20	3	301.85	318.968	7.4671
64	734	H	162	31.0	31.0	2	15/08/20	3	137.24	293.888	8.6001
65	738	H	161	28.5	28.5	4	15/08/20	3	297.39	404.497	7.1895
66	876	M	157	26.0	26.0	4	15/08/20	3	327.95	239.869	7.6948
67	878	H	157	30.0	30.0	1	15/08/20	3	299.79	236.010	7.5999
68	879	H	151	38.0	38.0	3	15/08/20	3	369.99	425.076	6.7928
69	880	M	204	30.0	30.0	4	15/08/20	3	204.17	271.380	6.5600
70	371	M	169	40.0	40.0	4	22/08/20	4	137.35	438.581	8.3073
71	709	M	152	26.0	26.0	2	22/08/20	4	233.51	171.702	7.0628

72	713	M	152	21.0	21.0	4	22/08/20	4	229.28	358.839	6.5517
73	715	M	150	46.0	46.0	3	22/08/20	4	277.27	308.678	7.1310
74	717	M	149	37.5	37.5	1	22/08/20	4	228.56	388.420	8.3425
75	721	M	145	29.0	29.0	1	22/08/20	4	298.35	353.694	7.0219
76	723	M	153	34.5	34.5	2	22/08/20	4	145.64	303.534	7.4394
77	725	M	164	31.5	31.5	3	22/08/20	4	296.73	250.801	6.5755
78	726	H	164	32.0	32.0	1	22/08/20	4	141.47	293.245	7.2756
79	728	H	155	36.0	36.0	3	22/08/20	4	289.36	224.435	7.7802
80	730	H	154	34.5	34.5	3	22/08/20	4	234.30	234.724	6.5312
81	732	H	162	26.5	26.5	4	22/08/20	4	253.24	216.718	7.9421
82	734	H	162	31.0	31.0	2	22/08/20	4	178.83	304.820	7.4633
83	738	H	161	28.5	28.5	4	22/08/20	4	251.40	285.528	7.4224
84	876	M	157	26.0	26.0	4	22/08/20	4	256.41	243.084	7.7410
85	878	H	157	30.0	30.0	1	22/08/20	4	98.09	302.248	7.3908
86	879	H	151	38.0	38.0	3	22/08/20	4	253.77	706.102	6.8720
87	709	M	152	26.0	26.0	2	29/08/20	5	170.59	313.180	7.5206
88	713	M	152	21.0	21.0	4	29/08/20	5	225.00	178.133	8.3484
89	715	M	150	46.0	46.0	3	29/08/20	5	240.25	287.457	7.7103
90	717	M	149	37.5	37.5	1	29/08/20	5	285.43	264.949	8.9571
91	721	M	145	29.0	29.0	3	29/08/20	5	294.52	347.263	7.9224
92	723	M	153	34.5	34.5	2	29/08/20	5	276.90	275.881	8.0776
93	725	M	164	31.5	31.5	3	29/08/20	5	220.99	311.894	7.4275
94	726	H	164	32.0	32.0	1	29/08/20	5	130.03	257.232	7.2274
95	728	H	155	36.0	36.0	3	29/08/20	5	190.16	321.540	7.9845
96	730	H	154	34.5	34.5	3	29/08/20	5	190.01	298.389	6.2962
97	732	H	162	26.5	26.5	4	29/08/20	5	250.55	324.112	7.6154
98	734	H	162	31.0	31.0	2	29/08/20	5	171.64	328.614	8.2828
99	738	H	161	28.5	28.5	4	29/08/20	5	224.44	299.675	8.5760
100	876	M	157	26.0	26.0	4	29/08/20	5	273.65	226.364	7.1050
101	878	H	157	30.0	30.0	1	29/08/20	5	105.02	249.515	7.8776
102	879	H	151	38.0	38.0	3	29/08/20	5	283.54	472.021	8.2414
103	880	M	204	30.0	30.0	4	29/08/20	5	135.06	266.235	6.9912
104	371	H	169	40.0	40.0	4	05/09/20	6	190.48	279.580	6.2211
105	709	M	152	26.0	26.0	2	05/09/20	6	111.04	232.152	7.0370
106	713	M	152	21.0	21.0	4	05/09/20	6	140.41	299.032	6.6128
107	715	M	150	46.0	46.0	3	05/09/20	6	173.75	241.798	7.0798
108	717	M	149	37.5	37.5	1	05/09/20	6	198.88	286.814	7.4270
109	721	M	145	29.0	29.0	3	05/09/20	6	114.66	250.801	6.4606
110	723	M	153	34.5	34.5	2	05/09/20	6	149.92	251.444	6.8830
111	725	M	164	31.5	31.5	3	05/09/20	6	260.37	282.312	6.1783
112	726	H	164	32.0	32.0	1	05/09/20	6	107.44	196.139	5.6640
113	728	H	155	36.0	36.0	3	05/09/20	6	148.14	198.712	6.6035
114	730	H	154	34.5	34.5	3	05/09/20	6	177.94	198.712	6.2243
115	732	H	162	26.5	26.5	4	05/09/20	6	181.79	227.850	6.5239
116	734	H	162	31.0	31.0	2	05/09/20	6	171.49	303.534	6.0702
117	738	H	161	28.5	28.5	4	05/09/20	6	146.17	309.322	6.3140
118	876	M	157	26.0	26.0	4	05/09/20	6	146.42	286.171	6.6407
119	878	H	157	30.0	30.0	1	05/09/20	6	109.92	256.589	6.8726
120	879	H	151	38.0	38.0	3	05/09/20	6	168.16	295.174	5.8739
121	880	M	204	30.0	30.0	4	05/09/20	6	169.79	299.032	6.5850
122	371	H	169	40.0	40.0	4	13/09/20	7	175.88	284.884	6.6331
123	709	M	152	26.0	26.0	2	13/09/20	7	126.70	327.971	6.6652
124	713	M	152	21.0	21.0	4	13/09/20	7	195.76	286.171	6.6260
125	715	M	150	46.0	46.0	3	13/09/20	7	187.37	257.232	7.0786
126	717	M	149	37.5	37.5	1	13/09/20	7	135.46	292.601	7.0466
127	721	M	145	29.0	29.0	3	13/09/20	7	173.13	263.020	6.6741
128	723	M	153	34.5	34.5	2	13/09/20	7	147.11	297.103	6.4905
129	725	M	164	31.5	31.5	3	13/09/20	7	164.33	387.777	6.3996
130	726	H	164	32.0	32.0	1	13/09/20	7	57.70	277.168	6.6508
131	728	H	155	36.0	36.0	3	13/09/20	7	75.72	246.300	6.1871
132	730	H	154	34.5	34.5	3	13/09/20	7	88.82	307.392	6.6072
133	732	H	162	26.5	26.5	4	13/09/20	7	105.12	333.115	7.0023
134	734	H	162	31.0	31.0	2	13/09/20	7	68.43	415.430	6.0749
135	738	H	161	28.5	28.5	4	13/09/20	7	117.74	340.189	6.4984
136	876	M	157	26.0	26.0	4	13/09/20	7	104.14	278.454	7.0760
137	878	H	157	30.0	30.0	1	13/09/20	7	76.03	372.343	7.7522
138	879	H	151	38.0	38.0	3	13/09/20	7	122.76	508.676	7.0257
139	880	M	204	30.0	30.0	4	13/09/20	7	107.48	495.172	6.0582
140	371	H	169	40.0	40.0	4	19/09/20	8	137.51	300.961	7.1094
141	709	M	152	26.0	26.0	2	19/09/20	8	98.97	236.010	6.8433
142	713	M	152	21.0	21.0	4	19/09/20	8	141.89	246.943	7.4392
143	715	M	150	46.0	46.0	3	19/09/20	8	131.40	291.315	6.9203
144	717	M	149	37.5	37.5	1	19/09/20	8	78.39	372.343	8.2143
145	721	M	145	29.0	29.0	3	19/09/20	8	116.37	223.792	7.5212
146	723	M	153	34.5	34.5	2	19/09/20	8	94.31	329.900	7.7037
147	725	M	164	31.5	31.5	3	19/09/20	8	124.85	296.460	7.2099
148	726	H	164	32.0	32.0	1	19/09/20	8	85.91	298.389	6.3913
149	728	H	155	36.0	36.0	3	19/09/20	8	118.78	359.482	7.0927
150	730	H	154	34.5	34.5	3	19/09/20	8	111.30	305.463	6.4013
151	732	H	162	26.5	26.5	4	19/09/20	8	111.98	257.232	6.4700
152	734	H	162	31.0	31.0	2	19/09/20	8	82.55	380.060	6.5436
153	738	H	161	28.5	28.5	4	19/09/20	8	98.71	365.913	6.5805

154	876	M	157	26.0	26.0	4	19/09/20	8	99.85	484.239	6.5788
155	878	H	157	30.0	30.0	1	19/09/20	8	72.69	339.546	7.2886
156	879	H	151	38.0	38.0	3	19/09/20	8	100.82	468.805	6.9236
157	880	M	204	30.0	30.0	4	19/09/20	8	89.72	284.884	7.0676
158	371	H	169	40.0	40.0	4	26/09/20	9	105.65	197.426	7.5597
159	709	M	152	26.0	26.0	2	26/09/20	9	88.43	100.964	6.8449
160	713	M	152	21.0	21.0	4	26/09/20	9	145.27	147.908	7.3237
161	715	M	150	46.0	46.0	3	26/09/20	9	138.45	161.413	6.8952
162	717	M	149	37.5	37.5	1	26/09/20	9	83.74	137.619	6.5537
163	721	M	145	29.0	29.0	3	26/09/20	9	102.17	142.121	6.8232
164	723	M	153	34.5	34.5	2	26/09/20	9	82.39	116.398	6.5888
165	725	M	164	31.5	31.5	3	26/09/20	9	78.60	147.908	6.3879
166	726	H	164	32.0	32.0	1	26/09/20	9	69.44	139.548	6.5369
167	728	H	155	36.0	36.0	3	26/09/20	9	79.08	207.072	6.2323
168	730	H	154	34.5	34.5	3	26/09/20	9	93.90	149.195	6.2825
169	732	H	162	26.5	26.5	4	26/09/20	9	99.53	127.973	6.7027
170	734	H	162	31.0	31.0	2	26/09/20	9	79.59	160.127	6.6859
171	738	H	161	28.5	28.5	4	26/09/20	9	75.93	290.029	5.4857
172	876	M	157	26.0	26.0	4	26/09/20	9	86.76	207.715	7.3254
173	878	H	157	30.0	30.0	1	26/09/20	9	67.36	179.419	7.1915
174	879	H	151	38.0	38.0	3	26/09/20	9	82.98	197.426	6.3528
175	880	M	204	30.0	30.0	4	26/09/20	9	82.83	242.441	7.0559
176	371	H	169	40.0	40.0	4	03/10/20	10	126.18	172.986	7.3689
177	709	M	152	26.0	26.0	2	03/10/20	10	73.82	264.949	7.1915
178	713	M	152	21.0	21.0	4	03/10/20	10	123.00	295.817	7.7054
179	715	M	150	46.0	46.0	3	03/10/20	10	117.09	273.952	6.4449
180	717	M	149	37.5	37.5	1	03/10/20	10	87.77	263.020	7.2417
181	721	M	145	29.0	29.0	3	03/10/20	10	116.15	297.103	6.9303
182	723	M	153	34.5	34.5	2	03/10/20	10	93.35	331.186	7.0843
183	725	M	164	31.5	31.5	3	03/10/20	10	88.69	338.903	6.6123
184	726	H	164	32.0	32.0	1	03/10/20	10	75.71	261.091	7.2904
185	728	H	155	36.0	36.0	3	03/10/20	10	73.15	265.592	7.5518
186	730	H	154	34.5	34.5	3	03/10/20	10	92.56	63.665	6.5830
187	732	H	162	26.5	26.5	4	03/10/20	10	108.47	223.792	7.3567
188	734	H	162	31.0	31.0	2	03/10/20	10	86.98	270.737	7.3567
189	738	H	161	28.5	28.5	4	03/10/20	10	108.20	308.035	8.0264
190	876	M	157	26.0	26.0	4	03/10/20	10	120.23	346.620	9.7277
191	878	H	157	30.0	30.0	1	03/10/20	10	81.18	262.377	7.3370
192	879	H	151	38.0	38.0	3	03/10/20	10	94.52	367.842	6.9358
193	880	M	204	30.0	30.0	4	03/10/20	10	92.31	272.666	6.3717
194	371	H	169	40.0	40.0	4	10/10/20	11	136.30	349.836	7.1185
195	709	M	152	26.0	26.0	2	10/10/20	11	115.91	245.014	6.5454
196	713	M	152	21.0	21.0	4	10/10/20	11	155.13	308.678	7.1292
197	715	M	150	46.0	46.0	3	10/10/20	11	134.78	263.020	7.4211
198	717	M	149	37.5	37.5	1	10/10/20	11	83.71	336.974	7.1865
199	721	M	145	29.0	29.0	3	10/10/20	11	133.90	316.395	7.1847
200	723	M	153	34.5	34.5	2	10/10/20	11	102.28	313.823	6.9895
201	725	M	164	31.5	31.5	3	10/10/20	11	115.00	311.251	7.3047
202	726	H	164	32.0	32.0	1	10/10/20	11	81.40	277.811	6.5938
203	728	H	155	36.0	36.0	3	10/10/20	11	102.06	300.961	6.7138
204	730	H	154	34.5	34.5	3	10/10/20	11	126.38	285.528	7.6450
205	732	H	162	26.5	26.5	4	10/10/20	11	129.30	272.666	7.4086
206	734	H	162	31.0	31.0	2	10/10/20	11	125.90	351.765	6.8982
207	738	H	161	28.5	28.5	4	10/10/20	11	138.58	347.263	7.6324
208	876	M	157	26.0	26.0	4	10/10/20	11	115.83	348.549	7.1059
209	878	H	157	30.0	30.0	1	10/10/20	11	83.53	292.601	6.7567
210	879	H	151	38.0	38.0	3	10/10/20	11	108.60	550.477	8.3774
211	880	M	204	30.0	30.0	4	10/10/20	11	103.01	281.669	6.4900
212	371	H	169	40.0	40.0	4	17/10/20	12	139.01	189.709	6.9385
213	709	M	152	26.0	26.0	2	17/10/20	12	80.22	437.294	7.1049
214	713	M	152	21.0	21.0	4	17/10/20	12	113.33	438.581	7.1557
215	715	M	150	46.0	46.0	3	17/10/20	12	123.92	487.455	7.1802
216	717	M	149	37.5	37.5	1	17/10/20	12	97.71	356.909	7.6554
217	721	M	145	29.0	29.0	3	17/10/20	12	101.02	267.521	7.3449
218	723	M	153	34.5	34.5	2	17/10/20	12	87.18	398.710	6.9069
219	725	M	164	31.5	31.5	3	17/10/20	12	87.03	452.728	6.8491
220	728	H	155	36.0	36.0	3	17/10/20	12	100.79	448.227	7.1714
221	730	H	154	34.5	34.5	3	17/10/20	12	99.88	108.037	5.8857
222	732	H	162	26.5	26.5	4	17/10/20	12	130.29	278.454	7.1136
223	734	H	162	31.0	31.0	2	17/10/20	12	84.78	122.185	6.6845
224	738	H	161	28.5	28.5	4	17/10/20	12	117.42	488.741	7.5708
225	876	M	157	26.0	26.0	4	17/10/20	12	113.82	418.002	7.6917
226	878	H	157	30.0	30.0	1	17/10/20	12	104.10	267.521	6.9893
227	879	H	151	38.0	38.0	3	17/10/20	12	118.87	440.510	7.1750
228	880	M	204	30.0	30.0	4	17/10/20	12	100.72	291.315	5.9575
229	371	H	169	40.0	40.0	4	24/10/20	13	129.95	356.266	6.9280
230	709	M	152	26.0	26.0	2	24/10/20	13	113.64	178.776	7.9037
231	713	M	152	21.0	21.0	4	24/10/20	13	133.53	204.499	8.3536
232	715	M	150	46.0	46.0	3	24/10/20	13	123.45	206.429	8.1086
233	717	M	149	37.5	37.5	1	24/10/20	13	103.65	187.136	8.0578
234	721	M	145	29.0	29.0	3	24/10/20	13	90.15	198.069	7.4938
235	723	M	153	34.5	34.5	2	24/10/20	13	88.66	181.992	6.5531

236	725	M	164	31.5	31.5	3	24/10/20	13	67.57	150.481	7.5095
237	726	H	164	32.0	32.0	1	24/10/20	13	69.28	221.220	7.2717
238	728	H	155	36.0	36.0	3	24/10/20	13	82.29	250.801	7.3230
239	730	H	154	34.5	34.5	3	24/10/20	13	98.55	242.441	7.2717
240	732	H	162	26.5	26.5	4	24/10/20	13	101.92	255.946	7.0101
241	734	H	162	31.0	31.0	2	24/10/20	13	71.56	293.888	8.4007
242	738	H	161	28.5	28.5	4	24/10/20	13	100.10	329.257	7.9726
243	876	M	157	26.0	26.0	4	24/10/20	13	100.94	292.601	8.5416
244	878	H	157	30.0	30.0	1	24/10/20	13	87.46	246.300	8.0038
245	879	H	151	38.0	38.0	3	24/10/20	13	100.29	422.504	6.8655
246	880	M	204	30.0	30.0	4	24/10/20	13	81.07	235.367	7.2113
247	371	H	169	40.0	40.0	4	11/10/20	14	116.74	349.836	7.6926
248	709	M	152	26.0	26.0	2	11/10/20	14	78.94	250.158	6.5233
249	713	M	152	21.0	21.0	4	11/10/20	14	100.28	239.869	7.3339
250	715	M	150	46.0	46.0	3	11/10/20	14	79.69	223.149	7.4639
251	717	M	149	37.5	37.5	3	11/10/20	14	53.55	252.730	6.9869
252	721	M	145	29.0	29.0	3	11/10/20	14	96.73	199.355	7.2242
253	723	M	153	34.5	34.5	2	11/10/20	14	75.57	246.300	6.2562
254	725	M	164	31.5	31.5	3	11/10/20	14	68.15	363.983	7.0229
255	726	H	164	32.0	32.0	1	11/10/20	14	65.65	351.765	6.6752
256	728	H	155	36.0	36.0	3	11/10/20	14	82.36	141.478	8.0091
257	730	H	154	34.5	34.5	3	11/10/20	14	82.66	188.422	7.0192
258	732	H	162	26.5	26.5	4	11/10/20	14	105.07	124.114	7.5297
259	734	H	162	31.0	31.0	2	11/10/20	14	71.14	201.284	7.2461
260	738	H	161	28.5	28.5	4	11/10/20	14	102.10	194.210	7.5901
261	876	M	157	26.0	26.0	4	11/10/20	14	106.91	257.232	8.6386
262	878	H	157	30.0	30.0	1	11/10/20	14	.	190.995	6.6305
263	879	H	151	38.0	38.0	3	11/10/20	14	.	345.334	6.9163
264	880	M	204	30.0	30.0	4	11/10/20	14	.	259.161	7.4337
265	371	H	169	40.0	40.0	4	06/11/20	15	.	303.534	7.5133
266	709	M	152	26.0	26.0	2	06/11/20	15	.	233.503	6.4912
267	713	M	152	21.0	21.0	4	06/11/20	15	.	174.275	6.4966
268	715	M	150	46.0	46.0	3	06/11/20	15	.	171.059	6.2713
269	717	M	149	37.5	37.5	1	06/11/20	15	.	194.210	6.4639
270	721	M	145	29.0	29.0	3	06/11/20	15	.	322.860	6.7492
271	723	M	153	34.5	34.5	2	06/11/20	15	.	176.204	6.5834
272	725	M	164	31.5	31.5	3	06/11/20	15	.	265.592	6.2322
273	726	H	164	32.0	32.0	1	06/11/20	15	.	230.866	6.1786
274	728	H	155	36.0	36.0	3	06/11/20	15	.	721.863	6.6980
275	730	H	154	34.5	34.5	3	06/11/20	15	.	243.084	6.0250
276	732	H	162	26.5	26.5	4	06/11/20	15	.	200.641	6.4078
277	734	H	162	31.0	31.0	2	06/11/20	15	.	246.943	6.3761
278	738	H	161	28.5	28.5	4	06/11/20	15	.	288.100	6.5614
279	876	M	157	26.0	26.0	4	06/11/20	15	.	277.168	6.5565
280	878	H	157	30.0	30.0	1	06/11/20	15	.	244.370	6.3005
281	879	H	151	38.0	38.0	3	06/11/20	15	.	436.726	6.1250
282	880	M	204	30.0	30.0	4	06/11/20	15	.	264.949	.

## Anexo V: Efecto del sexo y peso

The SAS System

1875

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.SELENTIO
Dependent Variable	Se
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	ANIM(CRUPO)
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
ANIM	16	171 709 713 715 717 721 723 725 726 728 730 732 734 738 876 878 879 880
GRUPO	4	1 2 3 4
SEMANA	16	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
SEXO	2	H M

Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	83
Columns in Z	0
Subjects	18
Max Obs Per Subject	15
Observations Used	261
Observations NOT Used	21
Total Observations	282

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	2101.83135946	
1	2	2100.01512046	0.00000013
2	1	2100.01500291	0.00000000

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS	ANIM(GRUPO)	68.1853
Residual		1331.53

Fit Statistics

Res Log Likelihood	-1050.0
Akaike's Information Criterion	-1052.0
Schwarz's Bayesian Criterion	-1052.9
-2 Res Log Likelihood	2100.0

The SAS System

1878

The Mixed Procedure

Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
1	1.82	0.1777

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GRUPO	3	12	10.51	0.0011
SEMANA	14	187	33.63	<.0001
GRUPO*SEMANA	42	187	2.06	0.0006
SEXO	1	12	8.47	0.0131
RESO	1	12	0.62	0.4469

The SAS System

## The Mixed Procedure

## Model Information

Data Set	WORK.SELENI0
Dependent Variable	Se
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	ANIM (GRUPO)
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
ANIM	18	371 709 713 715 717 721 723 725 726 728 730 732 734 738 876 878 879 880
GRUPO	4	1 2 3 4
SEMANA	16	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
SEXO	2	M F

## Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	83
Columns in Z	0
Subjects	18
Max Obs Per Subject	15
Observations Used	261
Observations Not Used	21
Total Observations	282

## Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	2101.83135946	
1	2	2100.01512046	0.00000013
2	1	2100.01500291	0.00000000

## Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS	ANIM (GRUPO)	68.1853
Residual		1311.53

## Fit Statistics

Res Log Likelihood	-1050.0
Akaike's Information Criterion	-1052.0
Schwarz's Bayesian Criterion	-1052.9
-2 Res Log Likelihood	2100.0

## The SAS System

1854

## The Mixed Procedure

## Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
1	1.82	0.1777

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GRUPO	3	12	10.51	0.0011
SEMANA	14	187	13.63	<.0001
GRUPO*SEMANA	42	187	2.06	0.0006
SEXO	1	12	8.47	0.0131
PESO INICIAL	1	12	0.62	0.4469

Contrasts

Label	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TESTIGO NEG VS SELENIO	1	13	7.61	0.0163
ORGANICO VS INORGANICO	1	13	2.73	0.1221
TESTIGO VS BOLO	1	13	20.06	0.0006

## Anexo VI: Matriz de correlaciones

The SAS System

Pearson Correlation Coefficients, N 3  
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Semana 0 GRUPO=1			Semana 0 GRUPO=2			Semana 0 GRUPO=3			Semana 0 GRUPO=4		
	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas
Se	1	-0.97179	-	1	0.99919	0.98356	1	0.29718	0.12964	1	-0.44013	0.00258
		0.18668	-		0.0256	0.1156		0.5673	0.8068		0.3824	0.9961
		0.1516	0.8805									
GSHPx	-	1	0.41309	0.99919	1	0.99002	0.29718	1	-0.2972	-	1	-
	0.97179		0.7289	0.0256		0.09	0.5673		0.5673	0.44013		0.67153
	0.1516									0.3824		0.1441
P. plas	-	0.41309	1	0.98356	0.99002	1	0.12964	-0.2972	1	0.00258	-0.67153	1
	0.18668			0.1156	0.09		0.8068	0.5673		0.9961	0.1441	
	0.8805	0.7289										
	Semana 1 GRUPO=1			Semana 1 GRUPO=2			Semana 1 GRUPO=3			Semana 1 GRUPO=4		
	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas
Se	1	0.99924	-	1	-1	-1	1	0.53698	0.38626	1	0.25409	0.27967
		0.95184	-		.	.		0.2719	0.4494		0.8271	0.5914
		0.0248	0.1988		.	.						
GSHPx	0.99924	1	-	-1	1	1	0.53698	1	-	0.25409	1	-
	0.0248		0.98287	.	.	.	0.2719		0.31031	0.6271		0.19082
			0.174	.	.	.	0.2719		0.5495			0.7172
P. plas	-	-0.98287	1	-1	1	1	0.38626	-0.31031	1	0.27967	-0.19082	1
	0.95184			.	.	.	0.4494	0.5495		0.5914	0.7172	
	0.1988	0.174		.	.	.						
	Semana 2 GRUPO=1			Semana 2 GRUPO=2			Semana 2 GRUPO=3			Semana 2 GRUPO=4		
	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas
Se	1	0.22726	0.85832	1	0.87083	0.99718	1	0.18726	-0.501	1	-0.19534	-
		0.654	0.343		0.532	0.0478		0.7224	0.3114		0.7107	0.02484
												0.9627
GSHPx	0.22726	1	0.68475	0.87083	1	0.72437	0.18726	1	0.51275	-	1	-
	0.654		0.511	0.532		0.4843	0.7224		0.2983	0.19534		0.89899
										0.7107		0.0148
P. plas	0.85832	0.68475	1	0.99718	0.72437	1	-0.501	0.51275	1	-	-0.89899	1
	0.343	0.511		0.0478	0.4843		0.3114	0.2983		0.02484	0.9627	0.0148
	Semana 3 GRUPO=1			Semana 3 GRUPO=2			Semana 3 GRUPO=3			Semana 3 GRUPO=4		
	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas

Se	1	-1	1	1	0.83229	-	1	-0.02884	0.45398	1	-0.4729	0.27873
					0.3741	0.56615 0.6169		0.9553	0.3658		0.4211	0.6498
GSHPx	-1	1	-1	0.83229	1	-	-	1	-	-0.4729	1	0.23488
				0.3741		0.92815 0.2428		0.02964 0.9553	0.11617 0.8265		0.4211	0.7037
P. plas	1	-1	1	-	-0.92815	1	0.45398	-0.11617	1	0.27873	0.23488	1
				0.56615 0.6169	0.2428		0.3658	0.8265		0.6498	0.7037	
-----												
Semana GRUPO=1			Semana GRUPO=2			Semana GRUPO=3			Semana GRUPO=4			
4			4			4			4			
-----												
	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas
Se	1	0.91378	0.90852	1	-0.92425	-	1	-0.28929	0.41708	1	-0.9012	-
		0.2683	0.2744		0.2494	0.90822 0.2778		0.5782	0.4107		0.0367	0.42539 0.4752
GSHPx	0.91378	1	0.99992	-	1	0.999	-	1	-	-0.9012	1	0.01121
	0.2683		0.0081	0.92425		0.0285	0.28929		0.12708 0.8104	0.0367		0.9857
P. plas	0.90852	0.99992	1	-	0.999	1	0.41706	-0.12706	1	-	0.01121	1
	0.2744	0.0081		0.90822 0.2778	0.0285		0.4107	0.8104		0.42539 0.4752	0.9857	
-----												
Semana GRUPO=1			Semana GRUPO=2			Semana GRUPO=3			Semana GRUPO=4			
5			5			5			5			
-----												
	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas
Se	1	0.92288	0.87296	1	-0.95615	0.26579	1	0.63108	0.60678	1	-0.04895	0.21682
		0.2517	0.3244		0.1892	0.8287		0.1791	0.2015		0.9377	0.7264
GSHPx	0.92288	1	0.61779	-	1	0.0282	0.63108	1	0.56518	-	1	-
	0.2517		0.5761	0.95615		0.0282	0.1791		0.2425	0.04895		0.04807
P. plas	0.87296	0.61779	1	0.1892	0.982	1	0.60878	0.56518	1	0.21682	-0.04807	1
	0.3244	0.5761		0.8287	0.982		0.2015	0.2425		0.7264	0.9388	
-----												
Semana GRUPO=1			Semana GRUPO=2			Semana GRUPO=3			Semana GRUPO=4			
6			6			6			6			
-----												
	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas
Se	1	0.7713	0.75781	1	0.9118	-	1	0.38675	-	1	-0.84627	-
		0.4392	0.4525		0.2894	0.85839 0.3429		0.4745	0.25656 0.6236		0.0338	0.48085 0.3577
GSHPx	0.7713	1	0.99978	0.9118	1	-	0.38675	1	-	-	1	0.35965
	0.4392		0.0133	0.2894		0.98333 0.0735	0.4745		0.44774 0.3733	0.84627		0.4838
P. plas	0.75781	0.99978	1	-	-0.99333	1	-	-0.44774	1	-	0.35965	1
	0.4525	0.0133		0.85839 0.3429	0.0735		0.25656 0.6236	0.3733		0.48085 0.3577	0.4838	
-----												
Semana GRUPO=1			Semana GRUPO=2			Semana GRUPO=3			Semana GRUPO=4			
7			7			7			7			
-----												
	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas	Se	GSHPx	P. plas
Se	1	-0.14403	0.06638	1	-1	0.85522	1	-0.03551	0.50437	1	-0.46142	-
		0.906	0.9577		0.001	0.3468		0.9468	0.3076		0.357	0.09239 0.8618

GSHPx	-	1	0.97783	-1	1	-	-	1	0.33521	-	1	-0.7809
	0.14403			0.001		0.85441	0.03551			0.46142		
	0.908		0.1343			0.3478	0.9468		0.616	0.357		0.0687
P. plas	0.06638	0.97783	1	0.85522	-0.85441	1	0.50437	0.33521	1	-	-0.7809	1
	0.9577	0.1343		0.3468	0.3478		0.3078	0.516		0.09239	0.8618	0.0687
	Semana	GRUPO=1		Semana	GRUPO=2		Semana	GRUPO=3		Semana	GRUPO=4	
	8			8			8			8		
	Se	GSHPx	P. plas									
Se	1	-0.81849	-	1	-0.91384	0.47602	1	-0.63353	0.25054	1	-0.48607	0.621
			0.55962			0.2662		0.1768	0.8321		0.3515	0.1882
			0.6219			0.6842						
GSHPx	-	1	0.99725	-	1	-	-	1	-	-	1	-
	0.81849			0.91384		0.07789	0.63353		0.33894	0.46807		0.51599
	0.5747		0.0472	0.2662		0.9504	0.1768		0.5137	0.3515		0.2947
P. plas	-	0.99725	1	0.47602	-0.07789	1	0.25054	-0.33694	1	0.621	-0.51599	1
	0.55962			0.8842	0.9504		0.6321	0.5137		0.1882	0.2947	
	0.6219	0.0472										
	Semana	GRUPO=1		Semana	GRUPO=2		Semana	GRUPO=3		Semana	GRUPO=4	
	9			9			9			9		
	Se	GSHPx	P. plas									
Se	1	-0.62987	-	1	-0.88794	0.76483	1	-0.34532	0.84166	1	-0.71309	0.61672
			0.57939			0.3043		0.5028	0.0356		0.1117	0.295
			0.6066			0.4456						
GSHPx	-	1	0.99799	-	1	-	-	1	-	-	1	-
	0.62987			0.88794		0.38281	0.34532		0.48607	0.71309		0.68279
	0.5662		0.0404	0.3043		0.7499	0.5028		0.3283	0.1117		0.2449
P. plas	-	0.99799	1	0.76483	-0.38281	1	0.84166	-0.48607	1	0.51572	-0.56279	1
	0.57939			0.4456	0.7499		0.0356	0.3283		0.295	0.2449	
	0.6066	0.0404										
	Semana	GRUPO=1		Semana	GRUPO=2		Semana	GRUPO=3		Semana	GRUPO=4	
	10			10			10			10		
	Se	GSHPx	P. plas									
Se	1	0.97021	-	1	0.80048	-	1	0.08852	-	1	0.83523	0.53799
			0.55714			0.20179		0.8678	0.60275		0.1753	0.2709
			0.6238			0.8706			0.2054			
GSHPx	0.97021		-	0.80048		-	0.08852		0.2075	0.63523		0.45494
	0.1558		0.33934	0.4092		0.74858	0.8678		0.6932	0.1753		0.3647
			0.7798			0.4815						
P. plas	-	-0.33934	1	-	-0.74858	1	-	0.2075	1	0.53799	0.45494	1
	0.55714			0.20179		0.8706		0.60275	0.6932	0.2709	0.3647	
	0.6238	0.7798		0.8706	0.4615		0.2054					
	Semana	GRUPO=1		Semana	GRUPO=2		Semana	GRUPO=3		Semana	GRUPO=4	
	11			11			11			11		
	Se	GSHPx	P. plas									
Se	1	0.74215	0.76978	1	0.26619	-	1	-0.48651	0.01318	1	0.24611	0.81633
			0.4508			0.28081		0.351	0.9802		0.8383	0.1926
						0.8188						
GSHPx	0.74215		0.99964	0.26619		0.85039	-	1	0.77063	0.24811		0.35803

	0.4676	0.017	0.8285	0.3527	0.46651	0.0729	0.6383	0.4885				
P. plas	0.75976	0.99964	1	-	0.85039	1	0.01318	0.77063	1	0.61633	0.35603	1
	0.4506	0.017	0.28081	0.8188	0.3527	0.9802	0.0729	0.1926	0.4885			
-----	Semana	GRUPO=1	-----	Semana	GRUPO=2	-----	Semana	GRUPO=3	-----	Semana	GRUPO=4	-----
-----	12	-----	-----	12	-----	-----	12	-----	-----	12	-----	-----
-----												
	Se	GSHPx	P. plas									
Se	1	-1	-1	1	-0.28574	-	1	0.30859	0.33333	1	-0.51461	0.32692
					0.61894			0.5518	0.5185		0.2962	0.5271
GSHPx	-1	1	1	-	1	0.92955	0.30859	1	0.72337	-	1	0.57199
				0.28574	0.8155	0.5751	0.5518	0.1042	0.2962	0.51461	0.2356	0.2356
P. plas	-1	1	1	-	0.92955	1	0.33333	0.72337	1	0.32692	0.57199	1
				0.61894	0.5751	0.2404	0.5185	0.1042	0.5271	0.2356		
-----	Semana	GRUPO=1	-----	Semana	GRUPO=2	-----	Semana	GRUPO=3	-----	Semana	GRUPO=4	-----
-----	13	-----	-----	13	-----	-----	13	-----	-----	13	-----	-----
-----												
	Se	GSHPx	P. plas									
Se	1	-0.54752	0.90985	1	-0.8215	-	1	0.29116	0.38147	1	0.10651	0.12652
		0.6311	0.2724		0.15461			0.5756	0.4555		0.8408	0.8112
GSHPx	-	1	-	-0.8215	1	0.69037	0.29116	1	-	0.10651	1	-
	0.54752	0.15094	0.9035	0.3863	0.5149	0.5756	0.71772	0.1083	0.8408	0.22459	0.6688	0.6688
P. plas	0.90985	-0.15094	1	-	0.69037	1	0.38147	-0.71772	1	0.12652	-0.22459	1
	0.2724	0.9035	0.15461	0.9012	0.5149	0.4555	0.1083	0.8112	0.6688			
-----	Semana	GRUPO=1	-----	Semana	GRUPO=2	-----	Semana	GRUPO=3	-----	Semana	GRUPO=4	-----
-----	14	-----	-----	14	-----	-----	14	-----	-----	14	-----	-----
-----												
	Se	GSHPx	P. plas									
Se	1	1	-1	1	0.93079	-	1	-0.68726	0.14489	1	0.69825	0.25925
					0.75893			0.1998	0.8162		0.1897	0.6737
GSHPx	2	2	2	0.93079	1	-	5	5	5	5	5	5
				0.2382	0.94445	0.2132	-	1	-	0.69825	1	0.19697
P. plas	2	3	3	-	-0.94445	1	0.68726	0.70159	0.1203	0.1897	0.7084	0.7084
		0.01778	0.9887	0.75893	0.4514	0.2132	0.1998	0.1203	0.1897	0.5	0.6	0.6
	-1	-0.01778	1				0.14489	-0.70159	1	0.25925	0.19697	1
		0.9887					0.8162	0.1203		0.6737	0.7084	
-----												
-----	2	3	3				5	6	6	5	6	6