



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“EVALUACION DE SALES DE SELENIO ORGANICO Y BOLOS
INTRA-RUMINALES DE SALES DE SELENIO INORGANICO”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JAIME JAIMES MIRANDA

TUTOR: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

COMITÉ TUTORAL: DR. JORGE TORTORA PÉREZ

DR. EFREN RAMÍREZ BRIBIESCA



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.

DEDICATORIA

A Cristina mi esposa que en las buenas y en las malas me ha apoyado y juntos hemos salido adelante.

Y a una personita muy especial la cual cambio toda mi vida... A mi hijo, Paquito.

Gracias los Amo mucho

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres por su apoyo y que aun ahora me siguen cuidando y viendo como su hijo, porque ahora entiendo que uno siempre será padre tenga la edad que tenga su cría.

A mis hermanas y abuela que siempre están ahí cuando las necesito.

A mis Maestros por darme un poco de su conocimiento, pero muy en especial a la Dra. Raquel que confió en mí y me enseñó lo bonita que es la farmacología y el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

A todos mis compañeros que de alguna u otra forma participaron en la creación de este trabajo.

A mis asesores por tener la paciencia de explicarme, corregirme y enseñarme, gracias Dra. Alma, Dr. Tortora, y Dr. Efrén.

Como no a agradecer al Maestro Pablo que hizo milagros para que yo manejara el cromatografo de gases.

A mi Comité tutorial.

Y a la UNAM por darme la oportunidad de regresar a la impartición de esas cátedras que te hacen ser un mejor profesionista, padre y un excelente ser humano y seguir contribuyendo a la investigación.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la evaluación de sales de selenio orgánico y bolos intra-ruminales de sales de selenio inorgánico. El estudio se dividió en dos fases: la fase *in vitro* y la fase *in vivo*, para poder determinar el comportamiento de los bolos administrados a los animales. La fase *in vivo* se realizó en corderos y fue dividida en dos: en la primera se evaluaron los bolos de matriz de carragenina con sales de selenio inorgánico (selenito de sodio y selenato de bario) y en la segunda se evaluó el uso de selenio orgánico utilizando un suplemento comercial de levaduras en el alimento (Selplex-Alltech). La fase *in vitro* consistió en someter a los bolos de carragenina a una digestión "*in-vitro*", en condiciones de pH, temperatura y movimiento controladas en un biodigestor, con el fin de determinar su degradabilidad. Indicar resultados

Se encontraron diferencias estadísticas en cuanto a concentración de selenio en sangre y líquido ruminal con respecto a los bolos de sales de selenio inorgánico sin encontrarse diferencias entre ellos. La rápida degradación de los bolos, como consecuencia del procedimiento experimental, determinó un cuadro de selenosis aguda caracterizado por la rápida caída del consumo de alimento y la depresión de los animales afectados. Con el uso de selenio orgánico no ocurrieron diferencias con el testigo. La suplementación de selenio por medio de bolos de liberación lenta de carragenina elaborados con selenio inorgánico administrados intra-ruminalmente mejoró las concentraciones de selenio en sangre sustancialmente, sin encontrarse cambios en el pH ruminal. El uso de sales de selenio orgánico de levaduras, no demostró efectos sobre la concentración de selenio en líquido ruminal, sangre, ganancias de peso o cambios de pH en rumen

ABSTRACT

In the present work it was realised the evaluation of salts of organic selenium and intraruminal bolus of salts of inorganic selenium. The study was divided in two phases: *in vitro* phase and the *in vivo* phase, to be able to determine the behavior of the bolus administered to the animal. The phase *in vivo* was realised in lambs and was divided in two: in first they evaluated the bolus of matrix of carragenina with salts of inorganic selenium (sodium selenite and selenato of barium) and in second evaluated the use of organic selenium using I supplement commercial of leavenings in the food (Selplex-Alltech). The *in vitro* phase consisted of putting under the bolus of carragenina to a digestion "in-vitro", in conditions of pH, controlled temperature and movement in a biodigestor, with the purpose of to determine its degradabilidad. To indicate results Were statistical differences as far as concentration of selenium in blood and ruminal liquid with respect to the bolus of salts of inorganic selenium without being differences among them. The fast degradation of the bolus, as a result of the experimental procedure, determined a picture of acute selenosis characterized by the fast fall of the food consumption and the depression of the affected animal. With the use of organic selenium differences with the witness did not happen. The suplementación of selenium by means of bolus of slow liberation of carragenina elaborated with inorganic selenium administered intraruminally improved the concentrations of selenium in blood substantially, without would find changes in the ruminal pH. The use of salts of organic leavening selenium, did not demonstrate effects on the concentration of selenium in ruminal liquid, blood, gains of weight or changes of pH in rume

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- 1 Introducción
- 2 Marco teórico
 - 2.1 Generalidades del selenio
 - 2.2 Características
 - 2.3 Formas químicas del selenio
 - 2.4 Selenoproteínas
 - 2.4.1 Proteínas con incorporación inespecífica de selenio.
 - 2.4.2 Proteínas específicas ligadoras de selenio.
 - 2.4.3 Proteínas con selenio bioactivo en la forma de selenocisteína codificada genéticamente (selenoproteínas).
 - 2.5 Metabolismo del Selenio
 - 2.5.1 Absorción
 - 2.5.2 Transporte y distribución
 - 2.5.3 Excreción
 - 2.5.4 Transformaciones metabólicas

- 2.5.5 Ruta metabólica propuesta para selenio.
- 2.5.6 Biodisponibilidad
- 2.6 Selenio en tejidos y fluidos animales
 - 2.6.1 Sangre
 - 2.6.2 Suero
 - 2.6.3 Relación de selenio en sangre/suero
 - 2.6.4 Leche
 - 2.6.5 Lana
 - 2.6.6 Orina
- 2.7 Selenio en los suelos y vegetales
 - 2.7.1 Los suelos
 - 2.7.2 Las plantas
- 2.8 Necesidades de Selenio En Los Alimentos.
- 2.9 Los microorganismos ruminales y selenio
- 2.10 Deficiencia de Selenio
- 2.11 Enfermedades asociadas con la deficiencia de selenio
 - 2.11.1 Enfermedad del músculo blanco (distrofia muscular nutricional)
 - 2.11.2 Retención placentaria
 - 2.11.3 Metritis-mastitis
- 2.12 Diagnostico

- 2.12.1 Análisis de sangre
- 2.12.2 Análisis de hígado
- 2.12.3 Análisis de Pelo o Lana
- 2.13 Toxicidad
 - 2.13.1 Mecanismo de toxicidad
- 2.14 Formas farmacéuticas para suplementar selenio
 - 2.14.1 Administración oral
 - 2.14.2 Inyección subcutánea
 - 2.14.3 Fertilización
- 2.15 Comprimidos intra-ruminales de selenio de lenta liberación
 - 2.15.1 Sistemas de liberación controlada
 - 2.15.2 Sistemas de liberación prolongada.
 - 2.15.3 Sistemas de liberación retardada.
 - 2.15.4 Sistemas de liberación lenta.
 - 2.15.5 Características de un sistema de liberación
 - 2.15.6 Mecanismos y sistemas de liberación controlada
- 2.16 Características generales de las carrageninas.
 - 2.16.1 Carragenina tipo iota.
- 2.17 Características de los bolos de selenio y su comportamiento
- 2.18 Manejo de la suplementación de selenio

- 3 Justificación
- 4 Objetivos
- 5 Hipótesis
- 6 Material y métodos
 - 6.1 Fase in vivo (parte I)
 - 6.1.1 Localización
 - 6.1.2 Características de las unidades experimentales
 - 6.1.3 Medicina preventiva
 - 6.1.4 Identificación de animales
 - 6.1.5 Distribución de tratamientos
 - 6.1.6 Alojamiento
 - 6.1.7 Fase de adaptación
 - 6.1.8 Cánulas
 - 6.1.9 Fistulación de animales
 - 6.1.10 Tratamientos
 - 6.1.11 Muestreo de líquido ruminal
 - 6.1.12 Muestreo de sangre
 - 6.1.13 Dieta
 - 6.1.14 Manejo de la alimentación

- 6.1.15 Características de los bolos
- 6.1.16 Peso de los animales
- 6.1.17 Instalaciones y equipo
- 6.2 Fase in vivo (parte ii)
 - 6.2.1 Localización
 - 6.2.2 Características de las Unidades Experimentales
 - 6.2.3 Medicina preventiva
 - 6.2.4 Identificación de Los Animales
 - 6.2.5 Distribución de los tratamientos
 - 6.2.6 Forma de administración de los tratamientos
- 6.3 Fase in vitro
- 7 Planteamiento estadístico
- 8 Métodos
 - 8.1 Determinación de selenio en sangre y liquido ruminal
 - 8.1.1 Espectrofotometría de absorción atómica.
 - 8.2 Determinación de los ácidos grasos volátiles
 - 8.2.1 Cromatografía de gases
 - 8.3 Digestibilidad in vitro
 - 8.4 Concentración de Selenio En Sangre Y Liquido Ruminal
- 9 Resultados

- 9.1 Concentración de selenio en liquido ruminal
- 9.2 Concentraciones de selenio en sangre
- 9.3 Pesos
- 9.4 Análisis de selenosis
- 9.5 Resultados De ph Ruminal (Parte I)
- 9.6 Resultados de la Prueba In Vitro
- 9.7 Concentraciones de ácidos grasos volátiles
 - 9.7.1 Concentraciones de ácidos grasos volátiles (parte I)
 - 9.7.2 Correlaciones entre respuestas (parte i)
- 9.8 Concentraciones de Selenio En Liquido Ruminal (Parte II)
- 9.9 Concentraciones de Selenio En Sangre (Parte II)
- 9.10 Pesos (Parte II)
- 9.11 Resultados De ph Ruminal (Parte II)
- 9.12 Concentraciones de ácidos grasos volátiles (parte II)
 - 9.12.1 Correlaciones entre respuestas (parte II)
- 10 Discusión
 - 10.1 Liberación de Selenio Al Medio Ruminal Por Los bolos De Carragenina (Parte I) 106
 - 10.2 Concentraciones de Selenio En Sangre (Parte I) 107
 - 10.3 Pesos (Parte I)
 - 10.4 Análisis de Selenosis

- 10.5 Ph Ruminal (Parte I)
- 10.6 Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (Parte I)
- 10.7 Concentración de Selenio En Liquido Ruminal (Parte II)
- 10.8 Concentración de Selenio En Sangre (Parte II)
- 10.9 Pesos (parte II)
- 10.10 Ph Ruminal (Parte II)
- 10.11 Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (Parte II)
- 11 Conclusiones
- 12 Bibliografía

II ÍNDICE DE CUADROS

TABLA	TITULO	PAGINA
1	Biodisponibilidad relativa de fuentes seleccionadas de selenio	33
2	Criterios para la interpretación de los análisis de selenio en bovinos	45
3	Concentraciones de selenio sérico según el laboratorio de diagnóstico de la Universidad Estatal de Michigan	45
4	Relación entre la concentración de selenio en sangre y deficiencia	45
5	Rangos de referencia para el selenio en sangre con relación al crecimiento de ovinos jóvenes	46
6	Concentraciones de selenio en sangre e hígado (base fresca) de ovinos con la enfermedad del músculo blanco en Nueva Zelanda	46
7	Signos clínicos de enfermedad álcali, selenosis o intoxicación crónica por Se	48
8	Dosis recomendada para ovinos según genotipo mg/kg de dieta (MS)	50
9	Distribución de animales por pesos en los diferentes tratamientos	65
10	Materias primas y % en la ración	68
11	Contenido nutrimental:	69
12	Selenito de sodio	70
13	Selenato de bario	70
14	Placebo	70
15	Distribución de animales por pesos en los diferentes tratamientos (testigo y selplex)	72
16		76

	Condiciones de digestión ácida para sangre.	
17	Condiciones de digestión ácida para líquido ruminal	76
18	Características de equipo de cromatografía de gases	77
19	Preparación del estándar externo de ácidos grasos volátiles	78
20	Datos de la curva de calibración EAA. De la solución patrón se tomaron los volúmenes indicados y la concentración de la solución final está en la columna central	80
21	Resultados de la lectura por EAA de las soluciones de la curva de calibración.	81
22	Parámetros estadísticos de la regresión lineal (EAA)	82
23	Datos del análisis de varianza de los intervalos de Tukey de las medias al 95% en líquido ruminal (Parte I)	83
24	Datos del análisis de varianza de los intervalos de Tukey de las medias al 95% en sangre (Parte I)	85
25	Concentraciones promedio de selenio por grupo (Parte I)	87
26	Concentraciones de selenio en sangre de animales testigo	88
27	Concentraciones de selenio en sangre de animales tratados con selenito	88
28	Concentraciones de selenio en sangre para selenato	89
29	Análisis de varianza para la Comparación de medias para el pH para los tratamientos (testigo, selenito y selenato) (Parte I)	90
30	pH promedio por tratamiento (Parte I)	90
31	Peso de los bolos en la prueba in-vitro	90
32	Datos de curva de calibración en la determinación de ácidos grasos volátiles	92

33	Constantes del cromatógrafo para la cuantificación de Acético, propionico y butírico.	94
34	Valores de r cuadrada en la Correlación de la concentración de Se en sangre y Concentración de Acético en liquido ruminal por tratamiento (Parte I)	95
35	Valores de r cuadrada en la Correlación en la Concentración de Se en liquido ruminal y Concentración de Acido Propionico en liquido ruminal por tratamiento (Parte I)	96
36	Valores de r cuadrada en la Correlación en la Concentración de Se en liquido ruminal y Concentración de Ácido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (Parte I)	97
37	Valores de las r cuadradas en la 17 Correlación en la concentración de Se en sangre y Concentración de Acido Butírico en liquido ruminal por tratamiento (Parte I)	98
38	Análisis de varianza de los Intervalos de Tukey al 95% de las medias de selenio en liquido ruminal (Parte II)	99
39	Análisis de varianza de los Intervalos de Tukey 95% confianza de medias de selenio en sangre (Parte II)	100
40	Valores de r cuadrada para la Correlación de la Concentración de Se en sangre y Concentración de Acético en liquido ruminal por tratamiento (Parte II)	103
41	Valores de r cuadrada para la Correlación de la Concentración de Se en Liquido ruminal y Concentración de Acido Propionico en liquido ruminal por tratamiento (Parte II)	103
42	Valores de r cuadrada para la Correlación en la Concentración de Se en Liquido ruminal y Concentración de Acido Butirico en liquido ruminal por tratamiento (Parte II)	104
43	Valores de r cuadrada para la Correlación en la Concentración de Se en sangre y Concentración de Acido Butírico en liquido ruminal por tratamiento	105

III INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Procedimiento de la evaluación in Vitro de los bolos intra-ruminales	73
2	Bolo con malla (sin expansión)	91
3	bolos sin maya (con expansión)	91

IV INDICE DE GRAFICOS

GRAFICA	TITULO	PAGINA
1	Curva de calibración obtenida (Regresión lineal del sistema).	81
2	Intervalos de Tukey de las medias al 95% en líquido ruminal (Parte I)	84
3	Comparación de niveles de selenio en función de días y tratamiento en líquido ruminal (Kruskall-Wallis) (Parte I)	84
4	Intervalos de Tukey 95% confianza de medias para concentraciones de selenio en sangre por tratamiento y día (Parte I)	85
5	Comportamiento de los pesos en el transcurso del tiempo (Parte I)	86
6	Comparación de la pendiente de concentración de selenio en sangre por individuo para los tratamientos selenito y selenato (Parte I)	87
7	Comparación de pendientes de concentración de selenio en sangre en las diferentes fases para selenito	88

8	Comparación de pendientes de concentración de selenio en sangre en las diferentes fases para selenato	89
9	Comparación de medias para el ph para los tratamientos (testigo, selenito y selenato) (Parte I)	89
10	Curva de calibración para Acético	92
11	Curva de calibración para Propionico	93
12	Curva de calibración para Butírico	93
13	Intervalos de confianza de medias de LSD al 95% de AGV (parte I)	94
14	Correlación de la concentración de Se en sangre y Concentración de Acético en liquido ruminal por tratamiento (Parte I)	95
15	Correlación en la Concentración de Se en liquido ruminal y Concentración de Acido Propiónico en líquido ruminal por tratamiento (Parte I)	96
16	Correlación en la Concentración de Se en líquido ruminal y la Concentración de Ácido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (Parte I)	97
17	Correlación en la concentración de Se en sangre y Concentración de Acido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (Parte I)	98
18	Intervalos de Tukey al 95% de las medias de selenio en líquido ruminal (Parte II)	99

19	Intervalos de Tukey 95% confianza de medias de selenio en sangre (Parte II)	100
20	Comportamiento de los pesos en el tiempo por tratamiento (Parte II)	101
21	Intervalos de tukey al 95 % de las medias pH (parte II)	101
22	Intervalos de confianza de medias de LSD al 95% de AGV (Parte II)	102
23	Correlación de la Concentración de Se en sangre y Concentración de Acético en liquido ruminal por tratamiento (Parte II)	102
24	Correlación de la Concentración de Se en Liquido ruminal y Concentración de Acido Propionico en liquido ruminal por tratamiento (Parte II)	103
25	Correlación en la Concentración de Se en Liquido ruminal y Concentración de Acido Butírico en liquido ruminal por tratamiento (Parte II)	104
26	Correlación en la Concentración de Se en sangre y Concentración de Acido Butírico en liquido ruminal por tratamiento	105

1.-INTRODUCCIÓN

El selenio es un elemento traza esencial para los humanos y los animales que es incorporado dentro de la molécula de más de treinta proteínas con actividad enzimática, en forma de selenocisteína. La primera de ellas, descubierta en 1973 es la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), la cual es vital para proteger a los glóbulos rojos y membranas celulares contra los peróxidos solubles que se forman en las reacciones oxidativas respiratorias y que se acumulan en los tejidos. Sin tal eliminación, las células musculares, pancreáticas, hepáticas y los glóbulos rojos de la sangre serían destruidos con rapidez. Esta acción protectora explica parte de los signos de la carencia del selenio (Coppes, 1999).

Existen diferentes sales de selenio, unas orgánicas y otras inorgánicas, en estudios anteriores se observó que los compuestos orgánicos de selenio son más biodisponibles que las formas inorgánicas de selenio. Asimismo, se ha observado que los animales son capaces de excretar al selenio cuando se encuentra en exceso en los alimentos y se supone que las formas orgánicas de selenio pueden llegar a ser menos tóxicas que las formas inorgánicas (Fish, 1982).

La deficiencia de este mineral ocasiona problemas de salud graves tanto en el humano como en los animales. En las vacas lecheras y borregos la deficiencia de selenio puede manifestarse en muerte embrionaria, neonatos débiles, disminución de la resistencia a enfermedades, alta incidencia de mastitis, retención de placenta, así como desórdenes de la fertilidad y la enfermedad del músculo blanco (Spross, 1998).

Como ocurre con casi todas las enfermedades por deficiencias nutricionales, frecuentemente pasan desapercibidas por el productor y el médico veterinario, hasta que el impacto económico es de consideración. Desafortunadamente los suelos del centro y el sur-este del país son deficientes en Selenio, lo que obliga tanto a Veterinarios como a Productores a estar en constante alerta.

Esta problemática de baja concentración de Selenio en los suelos mexicanos se demuestra en estudios realizados por Guerrero en 1995, quien señala que las zonas de Cuajomulco y Tres Marías, Morelos, en donde generalmente se

desarrolla una ganadería ovina en pastoreo y se producen grandes cantidades de forrajes, llegan a ser deficientes de Se y Cu. También en la zona de Ixtlahuaca, Estado de México, se han reportado animales enfermos por deficiencia de Se (Spross, 2000). En zonas del estado de Tlaxcala se han determinado problemas de deficiencia de selenio, encontrando una concentración por debajo de los mínimos requeridos en suelos y forrajes, siendo para la población de Carrillo Puerto de 0.051-0.052 ppm e Ixtenco 0.047-0.075 ppm respectivamente (Ramírez *et al*, 2001).

Aunado a las tierras deficientes en selenio, las prácticas modernas de fertilización y la expansión de las lluvias ácidas han reducido la cantidad de selenio en los alimentos. Además, existe muy poca o casi nula información, en cuanto a los niveles de los diferentes minerales tanto en suelos, como en alimentos, proporcionados a los animales (Huerta, 2006), el médico veterinario tiene que valerse de herramientas prácticas para resolver problemas de índole nutrimental, como las deficiencias minerales, que ocurren en forma particular en cada explotación. Es necesario por esto hacer uso de suplementos minerales que cubran los requerimientos de los animales, para lograr un estado de salud y producción adecuado (Borglound, 1988).

Existen diferentes maneras de suplementar selenio: soluciones inyectables, premezclas minerales añadidas en el alimento, adición de selenio al agua de beber, suplementación con fertilizantes antes, o durante la siembra, suplementos minerales en saladeros a libre acceso y últimamente en un estudio realizado por Bañuelos, 1999, se sugiere el uso de forrajes cultivados en suelos ricos en Selenio, para suplementar a los animales deficientes en este mineral. Sin embargo, siempre se busca un método que pueda dosificar con precisión, que no sean dosis únicas para todos los pesos y las diferentes especies, muchos de los fármacos que existen en el mercado solo contemplan la dosificación para grandes especies. También se busca reducir la frecuencia de tratamientos y de mano de obra para el manejo de los animales, que sea eficiente, que disminuya efectos traumáticos en el animal, que ofrezca disponibilidad por periodos prolongados y que disminuya los efectos colaterales al mínimo en particular la posible

intoxicación. La presentación que hasta ahora se aproxima mejor a estas características en rumiantes, son los bolos o comprimidos ruminales de lenta liberación. La administración de estos comprimidos se considera en ciertos casos como la más indicada (Spross, 2000).

Se han probado diferentes tamaños, concentraciones de Selenio y sobre todo diferentes matrices, para lograr la liberación del mineral en forma lenta y así aportar por tiempo prolongado el elemento al animal.

Dentro de las matrices que se han utilizado en la elaboración de bolos de selenio están el cemento dental, cemento, yeso y cemento pega azulejo, sin embargo por la naturaleza propia de estas matrices pueden contener sustancias tóxicas o nocivas para la salud, como el plomo en el cemento, un tóxico, acumulable en el organismo, en este caso en animales de consumo (Gutierrez, 2006). De lo anterior la importancia de buscar alternativas para la producción de fármacos de lenta liberación ruminal, una de estas sustancias son las carrageninas. Las carrageninas son carbohidratos con grupos sulfatados, extraídos de algas marinas. La adición de iones Ca^{++} induce la formación de un gel durable, elástico, adherible a mucosas, que propicia una liberación lenta y prolongada de fármacos (Mangione, *et al* 2003).

Estos bolos al ser incorporados al medio ruminal, interactúan con los microorganismos del rumen, que tienen la capacidad de incorporar selenio inorgánico a sus aminoácidos. La modulación de estos procesos no está claramente explicada, pero se ha relacionado con la disponibilidad y forma química del selenio en la dieta y el porcentaje de proteína y carbohidratos en la misma, entre los factores más significativos, que pueden modificar su transformación por parte de los microorganismos. (Koenig, *et al*; 1997)

La suma de todas estas interacciones, tanto físicas como químicas, explica el objetivo de este trabajo la importancia de determinar la forma farmacéutica más adecuada en bolos de lenta liberación y sus efectos en el contenido ruminal. Comparando las diferentes sales de selenio disponibles en el mercado tanto orgánicas como inorgánicas.

2.- MARCO TEORICO

2.1.-GENERALIDADES DEL SELENIO

El selenio fue descubierto en 1817 como un residuo rojo en el material de desecho, que se formaba durante la producción de ácido sulfúrico. Debido a que sus propiedades químicas eran similares a las del telurio, se describió como tal, hasta que poco después Berzelius en 1818, descubrió que se trataba de un nuevo elemento con propiedades únicas. Durante muchas décadas, el selenio se consideró un veneno altamente tóxico. No fue hasta 1957, cuando se descubrió que el selenio era un nutriente esencial (Schwarz y Foltz, 1957), que comenzaba a visualizarse por sus efectos positivos sobre el desempeño de los animales.

En investigaciones subsecuentes se demostró que el selenio era importante en la prevención de algunas enfermedades de los animales y en 1973 se identificó que era un componente de la enzima glutatión peroxidasa (Rotruck et al, 1973). La mayor parte de la investigación acerca del selenio se ha conducido con selenio inorgánico (selenito de sodio y selenato de sódio) y estas formas han sido de tremendo valor en la industria pecuaria.

2.2.-CARACTERÍSTICAS

El peso atómico del selenio es 78.96 y su número atómico es 34. Los estados de oxidación son Se^{2-} , Se^{4+} (SeO_3), Se^{6+} (SeO_4). Los isótopos naturales son: Se^{74} (0.9%), Se^{76} (9.0%), Se^{77} (7.6%), Se^{78} (23.5%), Se^{80} (49.8%), Se^{82} (9.2%). Los isótopos radioactivos son: Se^{72} (8.4 días), Se^{73} (7.1 h), Se^{75} (120 días) y Se^{79} (6.5×10^4 años). Ocupa el lugar 69 en abundancia terrestre.

Es un mineral traza, esencial para la salud (Tohmson, 2004; Goldhaber, 2003). Forma parte de las selenoproteínas, con propiedades antioxidantes, lo cual ayuda a prevenir el daño celular frente a los radicales libres. Éstos son productos derivados del metabolismo que contribuyen al desarrollo de patologías como el cáncer o la enfermedad coronaria (Goldhabe 2003; Combs *et al.* 1998). Por otra parte, colabora en la regulación de la función tiroidea y tienen un papel importante en el sistema inmune (McKenzie *et al.* 1998). Entre 1979 y 1981 dos equipos

independientes de investigadores demostraron la reversibilidad de los síntomas clínicos observados en humanos, en dos síndromes atribuidos a la carencia de selenio: la enfermedad de Keshan y la distrofia muscular aparecida tras períodos prolongados de nutrición parenteral (Robinson *et al*, 1981).

2.3.-FORMAS QUÍMICAS DEL SELENIO

El selenato ($H_2SeO_4^-$), contiene selenio en su estado de oxidación más alto (Se+6), es la especie más soluble y estable en agua bajo condiciones oxidantes. La formación y estabilidad de los elementos (+6) es favorecida por condiciones alcalinas. Los selenatos son altamente solubles y tóxicos, y en los suelos son disponibles para las plantas. El selenito (H_2SeO_3), contiene selenio en su estado de oxidación intermedio (Se+4), es estable bajo condiciones ligeramente anaerobias, es fácilmente reducido a la forma elemental bajo condiciones ácidas y esto provoca que no sea disponible para las plantas en el suelo (Gunther y Sazman 1972).

El empleo de selenato de bario por vía intramuscular ha demostrado incrementar la concentración de selenio en sangre por un largo período en caballos (Witchtel 1998). Los resultados de Zacharaa, 1993, demuestran que el selenato de bario inyectado a las ovejas, eleva el nivel del selenio en leche durante la lactancia y aumenta su concentración y la actividad de GSH-Px en la sangre de los corderos, en el período en que están en mayor riesgo de padecer la deficiencia. La suplementación con selenato de bario tiene la ventaja de que una dosis es capaz de mantener los niveles de Se durante varios meses (Lee *et al* 1999) y ha sido utilizada exitosamente en bovinos a pastoreo en el sur de Chile (Wittwer *et al* 2002). Zachara, 1992, encontró una respuesta a la administración de selenato de bario en madres y crías de borregos con aumento de la actividad de GSH-Px al momento del parto.

El selenito y selenato de sodio son igualmente efectivos, pero el selenato es preferido por ser de toxicidad más baja y menos irritante. Las soluciones de selenato de sodio (1 mg de selenio/ ml) son de mayor disponibilidad.

El producto de levaduras selenificadas tiene un gran potencial para ser la mejor forma de suplementación de Se en todas las especies, ya que tiene una alta

biodisponibilidad (McDowell, 1997). En estudios comparativos entre sales de selenio orgánico e inorgánico, se ha demostrado que suplementando los mismos niveles de selenio en la dieta, se observa mayor biodisponibilidad del primero, en puercos (Mahan, 1999; 2000) y ganado (Ortmann y Pehrson, 1999). La forma de Se orgánico incrementó el contenido del elemento en leche más que la inorgánica e incremento los niveles en sangre, leche e hígado de 2 a 3 veces más (Knowles et al. 1999). EL producto de levaduras enriquecidas en Se incrementó en un 130% más las concentraciones de Se en leche que el control, mientras que el incremento utilizando selenito o selenato fue solo del 20% (Ortman y Pehrson, 1999).

Es posible suponer que las formas orgánicas de selenio pueden llegar a ser menos tóxicas que las formas inorgánicas (Fish 1982).

2.4.-SELENOPROTEÍNAS

Las proteínas que contienen Selenio pueden dividirse según Behne y Kyriakopoulos, 2001 en:

2.4.1.-PROTEÍNAS CON INCORPORACIÓN INESPECÍFICA DE SELENIO.

Cuando se proporciona selenometionina en la dieta, parte del AA es metabolizado de la misma forma que otros compuestos de Selenio pero la mayor parte se incorpora en las proteínas en lugar de metionina. Esta incorporación depende de la relación selenometionina/metionina. Una alta proporción de selenometionina aunada a la deficiencia de metionina incrementa la cantidad de selenometionina en las proteínas.

2.4.2.- PROTEÍNAS ESPECÍFICAS LIGADORAS DE SELENIO.

En este grupo se describen dos proteínas: 14 kDa y 56 kDa. La proteína 14kDa puede regular crecimiento celular. Otra proteína de 17kDa podría servir en el transporte de Selenio. De 56 kDa esta la Tioredoxina reductasa 1 (2 x 56-kDa) (TrxR1), Tioredoxina reductasa 2 (56-kDa) (TrxR2), que se indica que da protección contra el estrés oxidativo en la mitocondria.

2.4.3.-PROTEÍNAS CON SELENIO BIOACTIVO EN FORMA DE SELENOCISTEÍNA CODIFICADA GENÉTICAMENTE (SELENOPROTEÍNAS).

Existe una jerarquía en la expresión de las selenoproteínas dependiente del tejido y la enzima. El orden en que se mantienen las concentraciones de Selenio durante una deficiencia en la rata son: cerebro > médula espinal > pituitaria > tiroides > ovarios > adrenales.

Estudios realizados con selenio radioactivo indican que hay más de treinta proteínas que contienen selenio fuertemente fijado a ellas. Diez de estas proteínas ya han sido caracterizadas, de las cuales ocho contienen selenio como selenocisteína:

- 1.- Glutation-peroxidasas GPx1,2,4 Enzimas antioxidantes: Eliminan el peróxido de hidrógeno, modulan la síntesis de eicosanoides modifican la inflamación y disminuyen el daño oxidativo de lípidos, lipoproteínas y DNA
- 2.- Selenoproteína de la cápsula espermática. Es una forma de la GPx4: protege del daño del oxidativo el desarrollo mitocondrial del esperma, es necesaria en la maduración espermática, esta selenoproteína contiene más de una selenocisteína, contiene seis secuencias Pro-Cys-Cys-Pro, con dieciocho a veinte residuos de cisteína. La pérdida de su estructura en la deficiencia de Selenio, explicaría los efectos adversos sobre los espermatozoides y la fertilidad del macho (Arthur 1994).
- 3.- Iodotironina-desiodinasa (tres isoformas) Producción y regulación del nivel de T3 a partir de T4
- 4.- Tioredoxina-reductasa (tres isoformas) Reducción de los nucleótidos en la síntesis del DNA, control del estado redox intracelular; reguladoras de la expresión genética por control redox de la unión de factores de transcripción al DNA
- 5.- Selenofosfato-sintetasa SPS2 Necesaria para la síntesis del selenofosfato precursor de la selenocisteína y, por tanto, de la síntesis de las selenoproteínas
- 6.- Selenoproteína P Proteína plasmática identificada en rata y humano, que contiene selenocisteína, representa entre el 60 y 80% del selenio plasmático. Se ha sugerido que pudiera tener un efecto protector de las células endoteliales frente

al ataque de peroxinitritos, aunque en principio se le adjudica como función el transporte de selenio en sangre (Hill, 1994).

7.- Selenoproteína W. es una proteína de bajo peso molecular, que contiene una mol de Se por mol de proteína, como selenocisteína. Probablemente es una proteína similar a la encontrada en músculo de corderos, la cual disminuía al presentarse la enfermedad del músculo blanco, se considera necesaria para la función muscular, se ha localizado también en las células epiteliales prostáticas, Parece tener una función redox similar a la GPx4. Quizá posee acción protectora de las células secretoras frente al carcinoma.

8.- Selenoproteína unida al DNA, de actividad similar a la glutatión-peroxidasa de 34kDa se ha localizado en el estómago y en el núcleo de los espermatozoides, en este caso podría participar en el desarrollo del esperma.

La enzima fosfolípido hidroperóxido-GPx (PHGPx) y la selenoproteína 18-kDa tienen preferencia en relación a glutatión peroxidasa celular (GPx) y plasmática (pGPx). Producida en riñón y otros órganos y son conservadas incluso en los estados de deficiencia de selenio.

Se ha propuesto que existe una selenoproteína que actúa en la transferencia de electrones del glutatión reducido, en el sistema citocromo de la mitocondria, una deficiencia severa de selenio provoca una disminución en el citocromo P₄₅₀.

Una función adicional del selenio es la detoxificación de metales pesados tales como mercurio, cadmio y talio.

La primera enzima caracterizada como dependiente del selenio fue la glutatión peroxidasa citosólica (cGSH-Px; EC 1.11.1.9), con un peso molecular de alrededor de 83,800 kDa con cuatro subunidades y 4 g-átomos de Selenio/mol, encargada de catalizar la reducción de los peróxidos para proteger a las células del daño oxidativo.

Esta acción es compartida con la catalasa, que tiene una actividad similar a glutatión peroxidasa y se encuentra en mayor concentración. Sin embargo, dado que cuando existe deficiencia de selenio, se presenta hemólisis, se deduce que la glutatión peroxidasa también destruye hidroperóxidos y es más importante que la catalasa.

La presencia de Selenio en la estructura de la enzima permite que exista una alta relación entre la concentración sanguínea o tisular de Selenio y la actividad de GSH-Px. En bovinos a pastoreo se ha establecido una correlación de 0,97 entre su actividad en los eritrocitos y la concentración sanguínea de Selenio.

La deficiencia metabólica de Selenio provoca una disminución en la actividad de GSH-Px, que se asocia a mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y consecuentemente a diversos síndromes asociados a su déficit nutricional, como la enfermedad del músculo blanco, debilidad neonatal, miopatía cardíaca, retención de placenta, abortos, degeneración testicular, inmunosupresión y mastitis).

Un exceso de H_2O_2 , puede dañar a los eritrocitos en dos formas: causar excesiva oxidación de la hemoglobina y reaccionar con los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de las membranas. Los hidroperóxidos formados pueden reaccionar adicionalmente con rompimiento de los enlaces C-C y con la destrucción de la membrana. La enzima glutatión peroxidasa citosólica puede destruir hidroperóxidos en el citoplasma, pero no en la membrana.

La vitamina E se considera que actúa a nivel de membrana previniendo, la cadena reactiva de auto oxidación de sus lípidos. Una forma adicional de interrelación entre la vitamina E y el selenio puede ocurrir vía la protección del selenio reducido por la oxidación.

Actualmente, además de la glutatión peroxidasa citosólica (cGSH-Px), se conoce un grupo de tres enzimas GSH-Px selenio dependiente:

- a) Glutatión Peroxidasa Plasmática (pGSH-Px): es distinta de la cGSH-Px tanto en su estructura como por su lugar de acción. Los lugares de mayor producción de esta enzima son los riñones y los pulmones, es una proteína secretoria liberada al plasma, donde actúa en defensa de los tejidos frente a los peróxidos circulantes (Avissar 1994;)(Takahashi 1990).
- b) Fosfolípido Hidroperóxido Glutatión Peroxidasa (PH-GSH-Px): es diferente de las demás glutatión peroxidases ya que es un monómero de aproximadamente 20KDa, tiene menos especificidad por el glutatión como sustrato, y esta estrechamente asociada con las membranas intracelulares

(Ursini 1997). La actividad de esta enzima esta mejor conservada en los animales deficientes en selenio que las otras glutatión peroxidasa, lo que estaría indicando una mayor y más importante actividad antioxidante. Así mismo tiene un sitio de fosforilación, lo que estaría indicando que podría tener un cierto papel en la regulación de la actividad de otras enzimas BrigeliusFloshe 1994; Schuckelt, 1991. Tiene una alta especificidad sobre los hidroperóxidos unidos a las membranas celulares, así como también a los hidroperóxidos de los ecosanoides. (Bryant 1983)

- c) Glutatión Peroxidasa Gastrointestinal (GI-GSH-Px): su principal acción es proteger a los mamíferos de los hidroperóxidos lipídicos ingeridos con la dieta.
- d) Glutatión peroxidasa no dependientes del selenio. Estas enzimas pueden utilizar solamente a los hidroperóxidos orgánicos como sustrato, a diferencia de las Seleno-GSH-Px que pueden reducir, además, al peróxido de hidrógeno (Ketterer 1989).
- e) Otras enzimas seleno dependientes. Iodotironina 5'-Deiodinasa. Es una enzima microsomal, transmembranica, con la porción catalítica (carboxil terminal) en el citosol. Esta enzima remueve un átomo de yodo (5') de la tiroxina, transformándola en 3, 5 3'-triiodotironina. El selenio parece jugar un rol esencial en este proceso, dada su habilidad para actuar como un fuerte catalizador y excitador de la reacción (Darmouth, 1996).

Existen tres tipos de selenodeiodinasas (Reed Larselenin, 1996):

Deiodinasa tipo 1 (D1), se expresa en hígado, riñón, tiroides y pituitaria, y su acción produce la 3-5-3'-triiodotironina T3 plasmática desde tiroxina T4, por 5'-deiodinacion, que puede ser inhibida por el 6n-propiltiouracilo (PTU).

Deiodinasa tipo 2 (D2), se encuentra en el sistema nervioso central, placenta y tejido adiposo marrón. también se le ha encontrado en tiroides con niveles 50-150 veces superiores a la placenta. Esta Iodotironina 5'-deiodinasa aparece como fundamental para la activación de la hormona tiroidea en los órganos blancos.

Deiodinasa tipo 3 (D3) se expresa en sistema nervioso central, placenta y epidermis fetal. Inactiva tanto a la T3 como a la T4.

En varios animales incluidos los rumiantes no se expresan deiodinasas en la glándula tiroidea, por lo que deberían existir respuestas diferentes en el metabolismo de la hormona tiroidea ante una deficiencia de selenio.

f) Enzimas del sistema Tioredoxina. Este sistema está constituido por la Tioredoxina (Trx), una ditio-proteína de bajo peso molecular, y la Tioredoxina reductasa (TR).

Es el dador de hidrógenos para la ribonucleótido reductasa, esencial para la síntesis del ADN, y para la disulfuro reductasa, involucrada en la regulación redox. El descubrimiento de que la tioredoxina reductasa de los mamíferos contiene selenocisteína, podría explicar el requerimiento de selenio para la proliferación celular (Bjornstedt, 1999).

2.5.-METABOLISMO DEL SELENIO

Las especies más comunes de plantas, algas marinas, bacterias y levaduras pueden sintetizar la metionina y la selenometionina, sin embargo los animales no pueden formar ninguna de las dos. Por esta razón la metionina está catalogada entre los aminoácidos dietéticos esenciales para los animales superiores. En la revisión del papel que desempeña el selenio en el metabolismo, se hace cada vez más evidente que la selenometionina puede ser considerada igualmente esencial. Esto se debe a que la selenometionina, primordialmente de las plantas, es la principal forma de este elemento traza.

Muchos factores influyen sobre el metabolismo del Selenio incluyendo la forma química del elemento (Cristaldi 2005).

El selenito y el selenato son metabolizados de manera diferente en sangre, el selenito es rápida y selectivamente capturado y reducido, por lo que se transfiere al plasma en forma de selenuro, se une selectivamente a la albúmina y es tomado por el hígado (Huerta, 2006).

El selenato es directamente tomado por el hígado sin haber sido procesado en sangre. Aunque el selenato y el selenito son metabolizados de forma diferente en

sangre, una vez que son tomados por el hígado, parecen ser metabolizados de la misma manera y con similar eficiencia.

La digestibilidad del selenio en los rumiantes es muy baja, alrededor del 29% en ovejas (Wright, 1966) y del 11% en vacas (Koenig *et al*, 1991). Esto se debe a que en el rumen el selenio se reduce a formas poco asimilables.

2.5.1.-ABSORCIÓN

Posiblemente en los rumiantes parte de la absorción de selenio se efectúa como selenometionina y selenocisteína, lo cual se debe a que las bacterias ruminales son capaces de metabolizar el selenio inorgánico e incorporarlo a la proteína bacteriana.

La digestibilidad del selenio en los rumiantes es muy baja, 30-40% (Huerta, 2006); sin embargo, en estudios realizados por Koenig *et al*, 1991, encontraron cifras menores que fueron del 11 al 13% para sales de selenio inorgánicas y orgánicas respectivamente, cantidad mas inferior a la de no-rumiantes, debido probablemente a la formación de compuestos insolubles en el rumen. El efecto reductor del contenido ruminal incrementa la cantidad de selenio reducido, y por tanto, de baja absorción por el animal. Por ello, la adición de ionóforos puede promover la absorción de selenio (Gerloff, 1992).

Las dietas animales contienen cantidades variables de sales de selenio orgánicas (predominantemente selenometionina) e inorgánicas que se incorpora en la formulación, no es sorprendente que sean absorbidas por mecanismos diferentes. El selenito es absorbido en el intestino por un proceso simple de difusión, mientras que el selenato es absorbido activamente en el íleon por un co-transporte con los iones de sodio. A diferencia del selenato, cuya absorción, es inhibida competitivamente por el sulfato, debido a una ruta de absorción compartida, la absorción del selenito no es influida por el sulfato (Wolffram *et al*.1986). En contraste con estas formas salinas, la seleniometionina de los forrajes y granos es absorbida en el intestino delgado por la vía del sistema de transporte activo dependiente de Na⁺ de los aminoácidos neutros (Wolffram *et al.*, 1989).

En los rumiantes el selenio constituye un elemento que se absorbe fácilmente en el tracto intestinal, siendo el duodeno el principal sitio de absorción (Spross, 2000).

2.5.2.-TRANSPORTE Y DISTRIBUCIÓN

El Se absorbido es transportado en plasma, aparentemente ligado a una proteína sintetizada en el hígado, denominada selenoproteína P (identificada en rata y humano). En humanos, las proteínas de transporte son lipoproteínas. En ratones se asocia a albúmina, mientras que en ovinos con globulinas. (Himeno, 1996).

El Selenio es incorporado a las células rojas sanguíneas, leucocitos, mioglobina, nucleoproteínas miosina, como parte de varias enzimas; posteriormente es reducido por glutatión y a continuación se une a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, por lo que llega a formar parte de la porción proteica de muchos tejidos en donde es almacenado en forma de selenometionina y selenocistina.

Los tejidos que acumulan mayor cantidad de selenio son: riñones > hígado > testículos > adrenales > eritrocitos (Huerta 2006)

Los productos ricos en selenometionina tiene la ventaja de servir como reservorios de selenio, en comparación con las sales inorgánicas de selenio, que son rápidamente eliminadas del organismo, de ahí que en el caso del selenio orgánico de levaduras, éste sea retenido más efectivamente en el músculo, leche y tejidos sin ser bioactivo.

2.5.3.-EXCRECIÓN

En condiciones de consumo de dietas ricas en este mineral o de suplementación parenteral, la eliminación o excreción del selenio se da a través de pulmones, heces y orina (Palmer, 2001).

Cuando se excreta por pulmones, es cuando las concentraciones de éste son tóxicas, y se elimina en forma de dimetilselenuro (Selenio $(\text{CH}_3)_2$) (draft Toxicological Profile for selenium, 2001).

La mayoría del Selenio consumido es excretado vía heces, debido a su poca absorción. El Selenio absorbido es excretado principalmente por la orina, como trimetilselenuro y en menor grado vía bilis. La excreción en orina puede ser variable, dado que cuando la disponibilidad de selenio es baja, disminuye su excreción (Huerta 2006).

2.5.4.-TRANSFORMACIONES METABÓLICAS

El selenio ingerido por los mamíferos es transformado a sales orgánicas ya sea como SeCys en las selenoproteínas a través del intermediario común selenuro, sin tener en cuenta el origen del selenio en la dieta, o en forma de residuos de SeMet en proteínas generales.

Una vez absorbido, el selenio dietético de origen inorgánico u orgánico es utilizado en la síntesis de las selenoproteínas, almacenado o excretado. Las selenoproteínas biológicamente activas, de las cuales se han identificado cerca de 30, son principalmente enzimas redox que contienen residuos de seleniocisteína en el sitio activo (Low y Berry, 1996). Aunque los destinos metabólicos de las sales de selenio inorgánicas y orgánicas dietéticas difieren, ambas serán usadas en la síntesis de las proteínas (incluyendo la selenocisteína dietética) y debe primero ser convertidas a la forma de selenuro inorgánico, selenuro de hidrogeno (H_2Se), antes del proceso específico de formación e incorporación de la selenocisteína en el sitio activo de alguna de las selenoproteínas (Daniels, 1996).

El selenato es tomado por el hígado y es utilizado para la síntesis de selenoproteínas o es excretado después de ser metilado o puede ser filtrado por el glomérulo y excretado directamente en la orina en forma de selenato, es utilizado con menor eficiencia, aproximadamente 0.25 comparada con selenito en sangre total, en administración parenteral.

El selenato (SeO_4) es reducido a selenito (SeO_3) y el selenito es reducido mediante la formación de selenodiglutatión a selenuro (Foster y Sumar, 1997). La selenometionina es activada inicialmente por adenosilación, desmetilada y convertida en seleniocisteína por vía de la selenohomocisteína y selenocistatión en analogía con la metionina (Schrauzer, 2000). El selenuro puede ser metilado a dimetilselenuro, que se excreta vía pulmones, o al ion trimetilselenio que se excreta vía riñones (Huerta, 2006).

2.5.5.-RUTA METABÓLICA PROPUESTA PARA EL SELENIO.

La selenocisteína es sintetizada por un RNA_t específicamente cargado vía un selenofosfato rico en energía. La formación de un compuesto selenofosfato lábil está catalizada por una selenofosfato sintetasa, se conocen dos formas de la selenofosfato sintetasa en mamíferos: una de ellas es una selenoproteína cuya actividad y expresión están directamente bajo control de la disponibilidad de selenio. La incorporación de la selenocisteína dentro de las proteínas está catalizada por selenocisteína- RNA_t-sintetasa para apagar a los codones UGA, determinación de síntesis.

2.5.6.-BIODISPONIBILIDAD

La biodisponibilidad se define como la característica biofarmacéutica que expresa simultáneamente la cantidad de fármaco absorbido (grado de absorción) y la velocidad con la cual el fármaco se absorbe, a partir de una dosis contenida en una forma farmacéutica administrada a un organismo vivo intacto, para llegar a la circulación general.

La actividad terapéutica es el resultado de una serie de fenómenos consecutivos a la administración de un medicamento, que depende del fármaco y constituye su evolución temporal *In vivo*, pero también depende del individuo al que se administra el medicamento existiendo una interacción permanente entre ambos factores. Tales fenómenos se pueden abarcar en tres fases: 1. Fase Biofarmacéutica, 2. Fase Farmacocinética y 3. Fase Farmacodinámica.

La fase biofarmacéutica está constituida por el conjunto de fenómenos comprendidos entre la administración del medicamento y la absorción propiamente dicha del fármaco (paso de sus moléculas desde el lugar de administración hasta la circulación sanguínea, a través de una barrera biológica). Según la vía de administración y la forma farmacéutica, estos fenómenos son más o menos complejos o numerosos, pero en conjunto contribuyen a la respuesta a disposición del fármaco en el organismo a partir del medicamento. Esta fase constituye uno de los puentes principales en la modulación de la actividad

terapéutica, ya que depende de factores relacionados con la vía de administración.

La fase biofarmacéutica consta de los siguientes pasos. 1.- Liberación (forma farmacéutica), 2.-Disolución (fármaco liberado), 3.- Difusión (fármaco disuelto), 4.- Penetración y Permeación (fármaco disuelto adjunto a la membrana celular con su consecutiva absorción).

Una de las formas más comunes de investigar la biodisponibilidad de diferentes preparaciones es comparar la forma y área de la curva tiempo-concentración plasmática. Así se puede detectar la fracción de la dosis de medicamento absorbida, relacionando el área bajo la curva con la que se obtiene al administrar la misma dosis por vía intravenosa. Existen tres índices de importancia: Máxima concentración plasmática, tiempo en que se obtiene la máxima concentración del fármaco y área de la concentración plasmática bajo la curva.

La biodisponibilidad del selenio, depende del método de suplementación utilizado. En ruminantes, se ha observado mayor disponibilidad de selenio empleando selenato de bario por vía intramuscular y a su vez mayor biodisponibilidad del selenio cuando éste es suministrado como sal orgánica por vía oral.

Tabla 1 Biodisponibilidad relativa de fuentes seleccionadas de selenio^a

Source	Aves		Cerdos		Bovinos		Ovinos		Ratas	
Selenito de sodio	100		100		100		100		100	
Selenio elemental	5	(1) ^b	-		-		0	(2)	0	(1)
Seleno-cistina	110	(9)	-		-		-		95	(6)
Seleno-metionina ^c	80	(12)	120	(2)	-		-		105	(12)
Seleno-metionina ^d	115	(17)	150	(1)	245	(1)	-		202	(2)
Seleno-yeast	-		-		290	(1)	100	(1)	135	(3)

^a Tomado de Ammerman *et al.* (1995^a). Valores promedio redondeados al "5" más cercano y expresados en relación a la respuesta relativa obtenida con selenito de sodio. El número de estudios involucrados se indica entre paréntesis.

^b Un estudio con acumulación de selenio en hígado o riñón con niveles altos de selenio reportaron valores relativos de 95 y 50, respectivamente para los dos tejidos.

^c Estudios en que la actividad de glutatión peroxidasa o incidencia de diatesis exudativa fue la variable de respuesta

^d Estudios en donde la retención de selenio en todo el cuerpo o en ciertos tejidos p la incidencia de fibrosis pancreática fueron la variable de respuesta.

(Huerta 2006)

2.6.-SELENIO EN TEJIDOS Y FLUIDOS ANIMALES

Si se inyecta en forma subcutánea selenito de sodio radioactivo en ovinos adultos, se puede observar una acumulación del selenio en la corteza renal, hígado y glándula adrenal, mientras que el músculo lo retiene en bajas cantidades. En cambio, la administración de selenometionina o selenocisteína determina, principalmente, su acumulación pancreática (Jacobsson 1966, citado por Huerta, 2006). En corderos el riñón sería el tejido con más selenio cuando el consumo de selenio es bajo, llegando a concentraciones más elevadas que el hígado, revirtiéndose esta concentración al ser suplementados con el mineral. (Cousins, 1961; Oh, 1976).

2.6.1.-SANGRE

En sangre el 80% del selenio se encuentra unido a los glóbulos rojos y el 20% restante a plasma, unido a las proteínas plasmáticas (Mc Connel, 1965).

El contenido de Se en sangre se relaciona bien con su consumo, porque mide el Se en suero y en la glutatión peroxidasa, localizada en los glóbulos rojos. Sin embargo, la respuesta a la suplementación, sobre el contenido de Se en sangre es lenta, en virtud de que la mayoría de la glutatión peroxidasa se incorpora a los glóbulos rojos al momento de la eritropoyesis, de tal manera que el efecto de la suplementación con selenio se manifestará completamente en sangre después de 90 a 120 días, que es el periodo de vida de los glóbulos rojos en sangre bovina (Stowe y Herdt, 1992).

Respecto al contenido de Se en sangre de ovinos, valores menores de 0.05 ppm, son deficientes; de 0.05 a 0.075 ppm, marginalmente bajos; de 0.076 a 0.1 ppm, marginalmente adecuados; y mayores a 0.1 ppm, adecuados (Wheatley, 1988).

El contenido de selenio puede variar de 10 a 20 ng/ml en animales deficientes, hasta 1340 a 3100 ng/ml en animales intoxicados (Huerta, 2006). Smith y Rae, 1999, reportan valores de ≥ 0.4 ppm en borregos de raza katadin encontraron signos de intoxicación aguda, 12 horas posteriores a la aplicación de selenito de sodio (Mu-se) 25 mg a los adultos y 10 mg a los corderos.

2.6.2.-SUERO

La medición de selenio en suero (o plasma) como indicador de la asimilación del suplemento es preferible, sobre la base que se correlaciona bien con el consumo o la administración del elemento y a que rápidamente se modifica en respuesta a la suplementación (Stowe y Herdt, 1992). En contraparte Maas et al; 1992, sugieren que la sangre completa es mejor para determinar los niveles de Se, por la posible contaminación del suero con Se liberado de los eritrocitos hemolisados.

2.6.3.-RELACIÓN DE SELENIO EN SANGRE/SUERO

La relación selenio en sangre/ suero es de 1 para cerdos, 1.4 a 1.5 para caballos y llamas, 2.5 para ganado lechero y 4 en borregos, especialmente neonatos. Cuando existe deficiencia, estas relaciones se incrementan, mientras que cuando existe exceso, las relaciones se estrechan (Stowe y Herdt, 1992).

Sin embargo, cuando ocurre hemólisis pueden existir problemas con la medición de selenio en suero o plasma, puesto que los valores se incrementarían por el Se celular (Huerta, 2006).

2.6.4.-LECHE

El contenido de selenio en leche según Grace y Clark, 1991, es en Bovinos de 25 ng/ml, Ovinos: 6 ng/ml. El rango de selenio en leche es de 2.9 a 9.7 ng/ml en diferentes partes de Nueva Zelanda. En Estados Unidos en regiones deficientes de selenio se han encontrado valores < 20 ng/ml, mientras que en regiones altas en selenio los valores son de 50 ng/ml. Otros niveles reportados en áreas seleníferas varían de 160 a 1270 ng/ml (Huerta, 2006)

En vacas lecheras alimentadas con 6 mg se/día se logra una estabilización de los niveles de selenio en suero (120 ng/ml) y en leche (50 ng/ml) (Huerta,2006).

2.6.5.-LANA

El contenido de selenio en lana es de 0.07 ppm con un rango de .027 a 0.57 ppm (Grace y Clark, 1991; Spross, 2000).

2.6.6.-ORINA

El contenido de selenio en orina puede ser de utilidad cuando existe exceso de selenio, porque es su principal ruta de excreción para lograr la homeostasis (Huerta, 2006).

2.7.-SELENIO EN LOS SUELOS Y VEGETALES

2.7.1.-LOS SUELOS

Los suelos derivados de rocas volcánicas tienen, en general, bajos niveles de selenio debido a la volatilización que sufriera este elemento durante la etapa ígnea. Por el contrario, las tierras arables que derivan de rocas sedimentarias, son ricas en este elemento (Lannek, 1975).

Las transformaciones químicas que sufre el selenio en el suelo dependen de la naturaleza (ácida o alcalina) y del drenaje del mismo. Fuertes precipitaciones pluviales pueden empobrecer un suelo por lixiviación, que se agrava en el caso de que existan pendientes, acumulándose el selenio en las partes bajas (Lannek, 1975).

Existen formas químicas sumamente móviles (selenatos) y formas bloqueadas por combinaciones con óxido de hierro (Perigaud, 1971).

Si bien el selenito predomina en los suelos ácidos o neutros y con buenas condiciones de humedad (Geering 1968), es más fuertemente absorbido por los componentes del suelo que el selenato (Barrow, 1989). Diversos autores asumen que la absorción del selenito por los suelos depende en gran medida de los óxidos (incluidos los hidróxidos y los oxi-hidróxidos) y la materia orgánica (Bar-Yosef, 1987).

Las sustancias del humus están, en general, cargadas negativamente y pueden competir con el selenito en la absorción de otros minerales del suelo. Este efecto negativo que la materia orgánica tiene sobre la absorción del selenito en los suelos, fue comprobado removiendo el carbono orgánico, determinándose que este proceso acelera su absorción (Saeki, 1994). La absorción del selenito por los óxidos de magnesio aumenta al disminuir el pH, observándose un gran incremento en las cargas superficiales negativas y un pequeño consumo de protones como

característicos de su absorción por los mismos. La fuerza de unión entre el selenito y el óxido de magnesio es mayor que con el óxido de aluminio, siendo además mayor la absorción del selenito que la del fosfato en todos los rangos de pH (Saeki, 1995).

Los forrajes cultivados en suelos alcalinos contienen más selenio (Gill y Rice, 1985) que los forrajes de suelos ácidos, esta interacción entre el pH del suelo y la absorción del selenito por los hidróxidos, se observa por ejemplo en los suelos de Hawai y Puerto Rico, los cuales si bien son ricos en el mineral (6-15 ppm y 1-10 ppm, respectivamente), tienen pH ácido (4.5-6.5) y el selenio se adsorbe fuertemente con el hidróxido ferrico, resultando inasimilable por las plantas (Mc Dowell, 1992).

Cuando el suelo contiene menos de 0.45 mg Se/kg MS es probable encontrar deficiencia de selenio.

2.7.2.-LAS PLANTAS

Los vegetales pueden o no acumular selenio. (Subcomité in Selenium, 1983).

Dado que permiten identificar los suelos seleníferos, las acumuladoras pueden ser clasificadas en dos grupos:

- a) Indicadoras primarias: Necesitan acumular selenio para su crecimiento. Corresponden a este grupo, especies de los géneros: *Astragalus*, *Machaerantera*, *Haplopappus* y *Stanleya*.
- b) Indicadoras secundarias: Acumulan selenio, pero no lo necesitan para su crecimiento. Son especies de los géneros *Aster*, *Atriplex* y *Grindelia*.

En las plantas no acumuladoras, la mayor parte de mineral se encuentra en las proteínas como selenometionina (Butler, 1961). En plantas acumuladoras, por el contrario, se encuentran como selenocistationina o seleno-metil-selenocisteina, no ligadas a las proteínas (Subcomité in Selenium, 1983).

El contenido promedio de Se en plantas varía de 0.01 a 1.0 mg/kg de peso seco y en las acumuladoras 4000 mg/kg peso seco.

En plantas no-acumuladoras, 2 mg Se/kg de peso seco es tóxico. Las plantas absorben selenato (SeO_4) o selenito (SeO_3), pero no pueden utilizar el selenio elemental u otras formas reducidas (Gill y Rice, 1985). La asimilación de selenato

es similar al sulfato, formando selenoaminoácidos. En plantas acumuladoras de selenio, los selenoaminoácidos no se incorporan a proteínas, mientras que en las no-acumuladoras, éstos se incorporan a proteínas, provocando mal funcionamiento de las mismas.

La concentración de selenio en los pastos tiene escasa correlación con la calidad del forraje, pero alta con el contenido de cenizas ($r= 0.52, P< 0.01$) y de hierro ($r= 0.41, P<0.01$) (Zust, 1996).

Para la determinación de Se en análisis de Forraje no es recomendable colectar las muestras de forraje con animales fistulados, debido a que no existe relación en el contenido de Se entre el forraje ofrecido y el forraje consumido. Las muestras para medición de selenio pueden ser secadas a 70 C, pues se ha demostrado que las pérdidas de compuestos volátiles del elemento son bajas (<3%). Cuando las muestras contienen menos de 0.05 mg Se/kg MS es probable encontrar deficiencias en los animales que los consumen.

El alto contenido de azufre en el suelo reduce el contenido de selenio en la planta (White y Somers, 1977).

2.8.-NECESIDADES DE SELENIO EN LOS ALIMENTOS

El NRC (1980) revisó la literatura publicada acerca de los requerimientos para rumiantes y concluyó que cuando la dieta contiene menos de 0.03 mg Se/kg MS es inadecuada y cuando contiene entre 0.03 y 0.05 mg Se/kg MS es marginal.

De 0.1 a 0.5 ppm de selenio en el suelo es la cantidad adecuada para satisfacer las necesidades de los animales a través de los forrajes. Valores menores a 0.09ppm se consideran deficientes (Ruth, 1970), se menciona que la concentración adecuada de Se en los forrajes y granos debe ser de 0.1 ppm; de 0.075 a 0.1 ppm, es moderadamente baja; 0.05 a 0.075 ppm, es baja; y menor de 0.05 ppm, deficiente (Arthur, 1971). El NRC (1988) sugiere proporcionar dietas con 0.3 ppm de Se para vacas lecheras. Para ganado de carne se sugieren 0.2 ppm y para ovinos 0.1 ppm

2.9.-LOS MICROORGANISMOS RUMINALES Y EL SELENIO

La capacidad de los rumiantes de absorber selenio en forma de selenito o selenato dietético es marcadamente pobre, debido a la naturaleza reductora del medio ambiente ruminal. Los microorganismos ruminales reducen gran cantidad del selenio inorgánico dietético a formas no absorbibles de selenuros (Wright y Bell, 1966). Como resultado, los estimados de absorción a partir de selenuros varían ampliamente, dependiendo del método y del criterio de respuesta usado, pero tienden a ser bajos. Los valores típicos señalados para la disponibilidad de selenio a partir de selenitos en rumiantes son de 25-30%.

El papel de los microorganismos ruminales en el metabolismo del selenio es más complicado que el problema de las sales de selenio inorgánicas, y es comparable en muchos aspectos con la forma en la cual los microorganismos intervienen sobre la calidad de la proteína dietética. A diferencia de los animales, las bacterias son capaces de sintetizar metionina, cisteína y sus análogos de selenio, la selenometionina y selenocisteína; estos selenoaminácidos son incorporados en la proteína microbiana. El contenido de selenio en la masa de bacterias ruminales se enriquece en relación con la dieta; y los microorganismos ruminales han demostrado que alteran su forma química de maneras diferentes a la reducción. El análisis del contenido de selenio de los microorganismos ruminales de ovejas alimentadas con una variedad de dietas, reveló que el contenido microbiano en selenio fue mayor que el de la dieta, cuando fue considerado en relación con la materia seca (promedio de 46-veces), con el nitrógeno (promedio de 11.3-veces) o el contenido de azufre (26-veces) (Whanger et al. 1978).

La forma del selenio presentada a los microorganismos y la cantidad relativa de concentrado en la dieta, también afecta el metabolismo microbiano del elemento. Van Ryssen et al, 1989, encontraron que la selenometionina fue el aminoácido predominante en las bacterias cuando fueron incubadas con selenometionina; sin embargo el selenoaminoácido predominante fue la selenocisteína, cuando lo fueron con selenito. Esto representa una ruta mediante la cual una porción de los suplementos de selenio inorgánico de las dietas en rumiantes, se metabolizan a selenoaminoácidos.

Los microorganismos ruminales también parecen utilizar más las sales de selenio orgánicas que las inorgánicas, Koenig et al, 1997, encontraron que la proteína bacteriana de dietas basadas en forrajes, como en concentrados, suministradas a ovejas, contenía más selenio marcado de origen orgánico que inorgánico. En una comparación entre selenito y selenolevaduras (SelPlex®) que contienen predominantemente selenometionina, en dietas con 55 y 75% de concentrados, Van Rhyssen, 1998, encontró en ambas, que el contenido de selenio microbiano fue mayor con selenito que en las dietas que incluían Selplex®.

Se ha observado que las bacterias ruminales son capaces de metabolizar el selenio inorgánico e incorporarlo a la proteína microbiana en forma de selenometionina (Amuerman, 1983).

Existe un microorganismo, en el rumen que tiene la capacidad de incorporar selenito ⁻⁷⁵ [Se] a los aminoácidos azufrados, en lugar del azufre, este microorganismo *Selenomona ruminatum* tiene la capacidad de transformar el selenito a selenio rojo elemental, el cual no puede ser utilizado por el rumiante.

2.10.-DEFICIENCIA DE SELENIO

La deficiencia de selenio es un problema importante para la producción de rumiantes del centro del país. En Tlaxcala, se ha determinado que el problema se debe a deficiencias de selenio en el suelo, que provoca forrajes deficientes. En el estado de México también se han encontrado concentraciones deficientes en forraje. El azufre interfiere con la absorción del selenio, las zonas con alta contaminación ambiental de azufre pueden ocasionar problemas de selenio a los animales (Huerta, 2006).

2.11.-ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LA DEFICIENCIA DE SELENIO

2.11.1.-ENFERMEDAD DEL MÚSCULO BLANCO (Distrofia Muscular Nutricional)

Esta patología se caracteriza por la degeneración de fibras o grupos de fibras musculares. Los músculos más afectados son los de mayor actividad metabólica: diafragma, intercostales, gastrocnemios, corazón.

Se presenta principalmente en rumiantes recién nacidos o, inclusive, antes del nacimiento y también son afectados animales adultos. (Silva *et al*, 2000).

Signos Clínicos

La distrofia muscular nutricional es la lesión característica de la deficiencia de Se en corderos y becerros, clínicamente se presenta una rigidez progresiva, que impide la locomoción y da lugar a debilidad muscular y cojera con la espalda arqueada. Debido a la falta de locomoción, factores secundarios como inanición e infecciones bacterianas contribuyen a la muerte del animal.

Cuando el daño se da en el músculo cardíaco y es severo, la debilidad muscular y la muerte aparecen en pocas horas, aún sin signos evidentes. Puede existir una recuperación espontánea sí no hay daños severos.

Incidencia

La incidencia en corderos es de la primera a la doceava semana de vida, con una mayor incidencia a las 3 semanas.

Lesiones

En el análisis post-mortem se observa decoloración, palidez simétrica de los músculos largos de la pierna, espalda, músculos intercostales y diafragma.

Zust *et al*. 1996, estudiando 37 casos clínicos en terneros, encontraron un predominio de signos cardio-respiratorios en 25 de ellos, mientras que los restantes 12 presentaban miopatía esquelética. Los datos de laboratorio indicaron para la forma miocárdica, una baja concentración de selenio sérico 9,7 mg/l, alta actividad de aspartato amino transferasa (AST) (1125 U/l) y creatin kinasa (CK)

(9169 U/l). Para la forma esquelética, AST (2797 U/l), CK (22650 U/l). Luego compararon el contenido hepático de selenio en animales suplementados y encontraron una diferencia altamente significativa ($P < 0.0001$) entre los animales suplementados regularmente (402 mg/kg) y los no suplementados (173 mg/kg)

La estacionalidad en la aparición de esta patología, podría explicarse por la riqueza en ácidos grasos poli-insaturados de los pastos en crecimiento, los que, en algunas ocasiones, pueden escapar a la hidrogenación en el rumen. Esto podría incrementar la concentración plasmática de los ácidos linoleico y linoleico. El ácido linoleico ha sido indicado como un importante factor en la miodistrofia nutricional de los terneros.

Etiopatogenia

La presentación de la enfermedad se podría explicar por dos mecanismos (Lamand, 1966):

a.- Acción tóxica de los peróxidos sobre los ácidos grasos y las proteínas de las membranas.

b.- Bloqueo enzimático principalmente en el ciclo de Krebs.

a.- Los ácidos grasos insaturados pueden dar origen a peróxidos tóxicos para las membranas. Estos peróxidos, a su vez, canalizarían la oxidación de otros ácidos grasos desencadenando una reacción en cadena.

b.- Las mitocondrias y los microsomas contienen un elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados y enzimas que pueden ser dañados por peroxidación. La alteración de los sistemas NADH-citocromo C reductasa, y Succino-oxidasa e las mitocondrias de hígado y corazón, son un reflejo de la peroxidación lipídica (Tappel, 1965).

Para su protección entraría en juego la glutatión peroxidasa citosólica (cGSH-Px) y la fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa (PHGSH-Px) (Ursini et al, 1997); como así también los sistemas Tioredoxina reductasa y Glutaredoxina (Bjornstedt et al, 1999). Cuando ocurre una deficiencia de selenio, la actividad de estas enzimas disminuye proporcionalmente, dejando sin neutralizar a los peróxidos que atacan las distintas estructuras. Se ha comprobado que una selenoproteína del músculo, similar a la selenoproteína W de la rata, es la primera en disminuir su

concentración al inicio de la miopatía inducida por deficiencia combinada de vitamina E y selenio (Arthur et al, 1994).

2.11.2.-RETENCIÓN PLACENTARIA

En los años 1960 ya se había observado una relación entre bajos niveles de selenio y retención placentaria.

Smith 1988, menciona que bajos consumos dietéticos de selenio pueden resultar e un incremento en la incidencia de metritis, mastitis o retención placentaria en los establos lecheros. Harrison et al., 1984, encontraron una incidencia del 17.5% de retención placentaria en el lote control, contra la no incidencia en el lote de vacas lecheras suplementadas con selenio y vitamina E, indicando que el selenio y la vitamina E no fueron efectivos cuando se suplementaron por separado. Así mismo se demostró que la administración de selenio redujo la incidencia de quistes ováricos del 47% en el lote control, al 19% en las vacas tratadas, y de metritis del 84% al 60% respectivamente.

Es probable que la retención placentaria debida a una deficiencia de selenio, este mediada por una alteración en la actividad de los leucocitos polimorfonucleares neutrofilos, Heuwieser y Grunert, 1987, constataron que una buena actividad quimiotactica de la placenta inmediatamente al parto, determinaba una buena expulsión placentaria (4.7 h), también observaron que si esta respuesta se demoraba existía una demora en la expulsión y que si la actividad era escasa ocurría retención placentaria.

2.11.3.-METRITIS-MASTITIS

La susceptibilidad a desarrollar metritis como consecuencia de la retención placentaria, aumenta respecto a animales sin retención, en el orden de 6.5 veces en vaquillas de primer parto y 5.8 veces en vacas múltiparas.

Erskine et al., 1987, encontraron que hatos con alto conteo en células somáticas en leche (SCC) tenían concentraciones de selenio y GSH-Px en sangre significativamente inferiores a los hatos con bajo conteo de SCC.

Cuando se suplementa la dieta de vacas lecheras con selenio y luego se desafían con bacterias por vía intra-mamaria, se puede apreciar un mayor flujo de

neutrófilos hacia la leche y un incremento de la muerte intracelular de las bacterias fagocitadas por los neutrófilos

2.12.-DIAGNÓSTICO

2.12.1.-ANÁLISIS DE SANGRE

La deficiencia de selenio puede detectarse mediante su evaluación en sangre completa, suero o eritrocitos (Cuadros 2, 3, 4, 5). La concentración crítica de Se en suero es de 30 $\mu\text{g/l}$ McDowell, 1985. El análisis de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa es un método más rápido; sin embargo, presenta algunos inconvenientes debido a la dificultad de asegurar el almacenamiento apropiado de la muestra, variaciones asociadas con el tipo de anticoagulante utilizado, la respuesta a la suplementación es retrasada, inconsistencia en las unidades para expresar las concentraciones de la enzima, y que las concentraciones de la enzima alcanzan un máximo aún cuando los niveles de selenio en suero continúan aumentando, ha provocado que este análisis no se utilice actualmente (Stowe y Herdt, 1992).

Otra enzima que se mide es la creatina fosfoquinasa (CK). Esta enzima incrementa su actividad hasta 10 veces cuando existe deficiencia de selenio y es de utilidad para detectar deficiencias subclínicas. Sin embargo, la enzima es inespecífica, demuestra daño muscular pero no necesariamente por deficiencia de Se. Los casos clínicos incrementan también LDH y AST en suero.

Las diferencias en concentraciones críticas dadas por McDowell, (1985) y las reportadas por Anderson *et al.*, (1979), puede deberse a condiciones de la explotación y al tipo de animales (Ellison, 1992). En Nueva Zelanda, los niveles críticos son más bajos que los reportados en otros países. Otros factores que pueden determinar estas diferencias pueden deberse al estado de vitamina E, prevalencia de enfermedades y niveles de otros minerales.

Cuadro 2 Criterios para la interpretación de los análisis de selenio en bovinos (Van Saun, 1990).

Categoría de diagnóstico	Concentración de selenio (ng/ml)		Glutación peroxidasa en sangre completa ^a (mU/mg de hemoglobina)
	Sangre	Plasma	
Deficiente	10-40	< 40	0-15
Marginal	50-90	40-70	15-25
Adecuado	> 100	> 70	> 25

^auna unidad de enzima = micromoles de NADPH oxidado por minuto por miligramo de hemoglobina.

Cuadro 3 Concentraciones de selenio sérico según el laboratorio de diagnóstico de la Universidad Estatal de Michigan^a.

Edad(días)	Bovinos	Caballos	Cerdos	Ovinos ^b
< 1	50-70	70-90	70-90	50-80
1-9	50-70	70-90	70-120	60-90
10-29	55-75	80-100	70-120	70-100
30-70	60-80	90-110	100-160	80-110
71-180	60-80	90-110	140-190	80-100
181-300	60-80	90-110	180-220	80-110
301-700	65-90	100-130	180-220	90-120
> 700	70-110	130-160	180-220	120-160

^aStowe y Herdt, 1992

^bSe cree que los caprinos tienen niveles similares

Cuadro 4 Relación entre la concentración de selenio en sangre y deficiencia

selenio en sangre (µg/l)	Categoría de diagnóstico
<50	Deficiente
51-75	Marginal bajo
76-100	Marginal
>100	Adecuado

Cuadro 5 Rangos de referencia para el selenio en sangre con relación al crecimiento de ovinos jóvenes (Nueva Zelanda, Ellison, 1992)

	Selenio en sangre, ng/ml	Núm. de trabajos
Deficiencia marcada	<5	8
Deficiencia ligera-moderada	5 a 10.1	10
Marginal	10.1 a 19.7	5
Adecuado	>19.7	5

2.12.2.-ANÁLISIS DE HÍGADO

Las concentraciones normales o esperadas de selenio en hígado varían de 1.2 a 2.0 µg/g de peso seco para todas las especies y edades (Stowe y Herdt, 1992).

La concentración crítica de selenio por debajo de la cual se presenta deficiencia, es de 0.25 ppm (McDowell, 1985). Algunos autores (Allaway *et al.*, 1996) sugieren 0.21 ppm como el nivel mínimo. Sin embargo, los estudios de Nueva Zelanda indican niveles más bajos en bovinos y en ovinos (cuadro 6)

Cuadro 6 Concentraciones de selenio en sangre e hígado (base fresca) de ovinos con la enfermedad del músculo blanco en Nueva Zelanda (Ellison, 1992)

	Muestra	Ranchos	selenio, ng/g (l)	
			Promedio	Rango
Enfermedad del músculo blanco congénita	Hígado	2	25	17 a 47
Enfermedad del músculo blanco retrasada	Hígado	12	48	22 a 98
	Sangre	12	16	6 a 33

Por lo anterior, el autor sugiere concentraciones en hígado superiores a 100 ng/g, y en sangre superiores a 39 ng/ml, para prevenir la presentación de la enfermedad del músculo blanco.

2.12.3.-ANÁLISIS DE PELO O LANA

La concentración crítica de selenio en el pelo o la lana es de 0.25 ppm (McDoweel, 1985).

2.13.-TOXICIDAD

El suplementar selenio tiene un riesgo latente, ya que como muchos microminerales, tienen un bajo margen de seguridad, entre una dosis adecuada de suplementación y una dosis tóxica. Los requerimientos de selenio en la dieta

van de 0.1 a 0.3 ppm de materia seca. Se han llegado a observar signos de toxicidad cuando se proporcionan 4 ppm de selenio. En forma general se considera que 3 ppm en materia seca es el nivel máximo de tolerancia en todas las especies (NRC, 1980). Sin embargo en recientes estudios, se a observado que el margen de toxicidad es más amplio. En cerdos alimentados con niveles de Se de 8.4 ppm por 5 semanas no se presentaron signos de intoxicación (Goehring, 1984). Así mismo Kim y Mahan, 2001, no observaron signos de selenosis en cerdos alimentados con sales de selenio orgánico e inorgánico a dosis de > 5 ppm 12 semanas. Cristaldi, 2005, demostró que los valores recomendados para corderos por el NRC son valores subestimados, ya que el no encontró signos de toxicosis hasta con una dosis de 10 ppm en corderos en crecimiento. Sin embargo en borregos Katadin adultos y corderos, administrándoles 25 y 10 mg de selenito de sodio subcutaneo respectivamente se encontraron signos de selenosis aguda 12 h post aplicación (Smith y Roe, 1999).

Existen elementos como el arsénico, el azufre y los metales pesados que disminuyen la toxicidad del selenio, pero también las dietas altas en proteínas aparentemente juegan un papel importante como factores protectores en contra de sus efectos tóxicos. Estudios comparativos entre selenito de sodio, selenocistina y selenometionina han demostrado que los seleno-aminoácidos muestran menor toxicidad, aún cuando en el caso de selenocistina se pudo observar efectos adversos en el sistema succinoxidasa del hígado (Fish, 1982).

La intoxicación puede clasificarse de bajo nivel tipo “tremores ciegos”, de bajo nivel tipo “álcali” y de alto nivel (Cristaldi, 2005).

La intoxicación de bajo nivel, con “tremores ciegos”, se presenta cuando se consumen cantidades limitadas de plantas acumuladoras de selenio (*Astragalus*, *Machaeranthera*, *Haplopappus*, *Stanleya*). Los animales afectados caminan sin rumbo fijo, se tropiezan, están ciegos y exhiben algún tipo de falla respiratoria. Es posible que estos signos se deban a alcaloides presentes en las plantas acumuladoras, dado que los compuestos puros de selenio no producen esta condición. Entre los alcaloides identificados se encuentra la locoina en *Astragalus*.

La intoxicación de bajo nivel (crónica) tipo “álcali” se presenta cuando se consumen plantas que contienen entre 5 y 40 ppm de Se durante varias semanas o meses. Los animales presentan deformaciones de los cascos, pérdida del pelo de la cola y emaciación.

La intoxicación de alto nivel (aguda) se presenta cuando los animales ingieren cantidades elevadas de plantas acumuladoras o reciben dosis parenterales u otros tratamientos para causar muerte súbita o signos severos como respiración dificultosa, ataxia, postura anormal, postración y diarrea (Cristaldi, 2005).

Las plantas acumuladoras de selenio pueden contener hasta 300 ppm de selenio. Cultivos normales como *Phleum pratense* y *Medicago sativa* cultivadas en suelos seleníferos pueden contener hasta 33 y 40 ppm de selenio (Huerta, 2006).

La intoxicación por selenio se puede determinar mediante análisis del hígado (5 a 15 ppm de Se) o pelo (>10 ppm) (Huerta, 2006).

Cuadro 7 Signos clínicos de enfermedad álcali, selenosis o intoxicación crónica por Se.

(Cristaldi 2005.)

REFERENCIA	NIVELES DE se	SIGNOS Y LESIONES
NAS, 1971	5-40 ppm en grano	Degeneración y necrosis del miocardio
NRC, 1983	5-40 ppm en grano	Cirrosis hepática, claudicación, malformaciones de la pezuña, alopecia, emaciación

2.13.1.-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 oxido-reducción del organismo. Cuando el selenio se administra en forma de selenato, entra al organismo y se reduce a selenito; así es llevado al torrente sanguíneo al hígado y al bazo 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 el glutatión para formar selenotrisulfitos 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 los órganos en que se deposita en 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.

2.14.-FORMAS FARMACÉUTICAS PARA SUPLEMENTAR SELENIO

Existen diferentes maneras de suplementar selenio: soluciones estériles para inyección hipodérmica, premezclas minerales añadidas en el alimento, adición en el agua, en fertilizantes antes o durante la siembra, suplementos minerales en saladeros a libre acceso, el uso de forrajes cultivados en suelos ricos en Se (Bañuelos 1999).

Las principales formas de suplementar este elemento son la vía oral, inyección subcutánea y la fertilización del suelo.

2.14.1.-ADMINISTRACIÓN ORAL

La dosificación oral se realiza con selenito, selenato de sodio, bario, potasio o selenolevaduras y las dosis recomendadas para evitar la presentación de la deficiencia de selenio son:

Cuadro 8 Dosis recomendada para ovinos según genotipo mg/kg de dieta (MS)

EM mcal/kg dieta	GENOTIPO (OVINOS, mg/Kg de dieta (MS))		
	Pequeño	Mediano	Grande
1.8	0.03	0.03	0.03
2.0	0.07	0.08	0.11
2.2	0.11	0.12	0.17
2.4	0.13	0.15	0.21
2.6	0.15	0.18	0.25
2.8	0.17	0.19	0.27
3.0	0.18	0.21	0.29

(Huerta, 2006)

Las sales minerales pueden contener entre 26 y 132 mg Se/kg; concentraciones de 264 mg Se/kg han provocado menores ganancias de peso en bovinos (Minson, 1990). En Estados Unidos se permite hasta 120 mg Se/kg en las sales minerales para bovinos, sin que el consumo total exceda 3 mg cabeza/día en ganado para carne. Para ovinos, el nivel permitido en las sales es de 90 mg Se/kg, sin que el consumo exceda 0.7 mg día/cabeza (Huerta, 2006).

2.14.2.-INYECCIÓN SUBCUTÁNEA

Las ovejas reciben 0.1 mg/kg/pv de selenio, 3 y 4 semanas antes del empadre para prevenir la infertilidad.

Los corderos reciben de 0.1 mg/kg/pv de selenio a intervalos de 2-3 meses.

Las vacas reciben 0.1 mg/kg/pv de selenito mas 680 UI de vitamina E antes del parto para prevenir la retención de placentas.

Los becerros reciben de 20 a 30 mg de selenito o selenato de sodio a intervalos de 2-3 meses (Huerta, 2006).

2.14.3.-FERTILIZACIÓN

Se propone fertilización con 10 g Se/ha en forma de selenato de sodio, cada año. El selenito de sodio tiene poca efectividad, dado que se recupera únicamente 2% en el forraje, en relación al 35% cuando se aplica selenato de sodio (Huerta, 2006).

Sin embargo, siempre se busca un método que pueda dosificar con precisión, reducir la frecuencia del tratamiento y mano de obra para el manejo de los animales y que sea eficiente, que disminuya la incidencia del trauma al animal y

además que ofrezca disponibilidad por periodos prolongados. Uno de ellos es el empleo de bolos ruminales. En varias partes del mundo se han usado bolos ruminales de liberación lenta para suplementar al ganado en pastoreo y se ha demostrado que aumentan las concentraciones de selenio en sangre e hígado y los niveles de glutatión peroxidasa en ganado bovino y ovino (Ammerman, 1995; Hidiroglou, 1987; Donald, 1993; Rosiles, 1998; Millar, 1988; Swecker, 1989).

2.15.-COMPRESOS INTRA-RUMINALES DE SELENIO DE LENTA LIBERACION

La suplementación de selenio a través de sistemas de lenta liberación (SLL), como los bolos intra-ruminales, ha sido empleada desde finales de los 60's. Los bolos intra-ruminales tienen la ventaja de proporcionar selenio por períodos más prolongados de tiempo, que cuando se suplementa en forma parenteral, por lo que pueden resultar más seguros en la prevención de la deficiencia y se minimiza el riesgo de toxicidad.

Estas formas farmacéuticas se administran por vía oral y son retenidos en el retículo-rumen (Kuchel y Buckley, 1969), y asegura la liberación controlada del fármaco, así como su mantenimiento en el rumen por días, semanas, meses o años, dependiendo del tiempo de liberación del fármaco. Los SLL se agrupan en dos categorías básicas, aquellos que liberan activo de manera constante a lo largo de todo su tiempo de vida, dispositivos de liberación sostenida y los que liberan dosis discretas de una forma pulsátil, dispositivos de liberación intermitente (Gyurik, 1983).

Los bolos intra-ruminales tienen la ventaja de proporcionar cantidades de selenio por periodos más prolongados de tiempo que cuando se suplementa en forma parenteral (Vandame y Ellis, 2004). La liberación prolongada se puede lograr controlando la densidad de la formulación o el tamaño del dispositivo (Kendall et al., 2001).

El inconveniente de los bolos, es su administración ya que requiere de otro tipo de manejo, requiriéndose de una persona que lo proporcione con una pistola especial de bolos, la cual sirve para sostener el bolo y posteriormente dejarlo caer en el esófago del animal.

El manejar la densidad del bolo es un factor crítico determinante en la retención del sólido en el retículo. Por lo tanto en este caso es importante considerar un rango de densidades de 1.5 a 8.0, dependiendo del tipo de animal al que se aplicara (Blodinger, 1983).

2.15.1.-SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Es la terminología adoptada por la FDA para definir aquellos sistemas de liberación de fármacos en los que se modifica su velocidad de liberación y el lugar donde se liberan, para alcanzar los objetivos terapéuticos. En la terminología adoptada por la Unión Europea y por la USP 23, a los sistemas de liberación controlada se les denomina sistemas de liberación modificada.

Dentro de este grupo se definen dos tipos de sistemas de liberación modificada: los sistemas de liberación prolongada y los sistemas de liberación retardada (Doménech, 2001).

2.15.2.-SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA.

Son aquellos sistemas que permiten una reducción de la frecuencia de dosificación, de por lo menos dos veces un intervalo de dosificación, es decir, un valor como mínimo del doble respecto al que presenta un sistema convencional (Ramírez, 2006).

2.15.3.-SISTEMAS DE LIBERACIÓN RETARDADA.

Son aquellos sistemas que no liberan el fármaco inmediatamente después de su administración, es decir presentan un significativo periodo de latencia.

2.15.4.-SISTEMAS DE LIBERACIÓN LENTA.

Son aquellos sistemas que liberan al fármaco más lentamente que un sistema convencional, pero cuya velocidad de liberación no es lo suficientemente lenta como para permitir reducir la frecuencia de la administración.

Son formulaciones que se diseñan con la finalidad de prevenir o minimizar los efectos secundarios indeseables que puedan presentarse utilizando los sistemas

convencionales, de forma que permiten disminuir el valor de la concentración plasmática máxima (Ramírez, 2006).

2.15.5.-CARACTERÍSTICAS DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN (ROMAN, 1990)

Dentro de las características que debe tener un sistema de liberación prolongada se consideran:

- Ser capaz de controlar la cinética de liberación, de tal forma que pueda adaptarse a la farmacocinética de diversos fármacos (flexible).
- Ser aplicable a una gran variedad de ingredientes activos, independientemente de sus propiedades fisicoquímicas (flexible).
- Ser capaz de controlar en forma reproducible una velocidad constante de liberación del fármaco.
- No ser demasiado sensible a variables fisiológicas tales como: motilidad, vaciado gástrico, pH, volumen de fluido, contenido intestinal, concentración y presencia de enzimas, estado de ayuno, tipo de alimentación presente, posición física, nivel de actividad del paciente, variabilidad individual, estado del padecimiento entre otros.
- Estar fundamentado en principios fisicoquímicos.
- Ser capaz de conseguir el mayor nivel de dispersión del fármaco en el sitio de absorción.
- Mantener o incrementar la estabilidad del fármaco.
- La cantidad de excipiente que controla la liberación no debe agregar demasiado tamaño al producto

2.15.6.-MECANISMOS Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA (VILA, 2001; BRANNON, 1997)

Un sistema de liberación controlada precisa debe de contar con, un profundo conocimiento de los diferentes mecanismos implicados en la liberación de un principio activo a partir de una forma de dosificación.

El proceso que interviene con mayor frecuencia en estas formas de dosificación es la difusión, pero, puesto que los mecanismos capaces de controlarla son múltiples, es conveniente establecer la siguiente clasificación.

- a) Sistemas monolíticos o matriciales
- b) Sistemas reservorio
- C) Sistemas activados por el disolvente
- d) Sistemas controlados químicamente

2.16.-CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS CARRAGENINAS.

Las carrageninas son parte de la familia de los carbohidratos con grupos sulfatados, son extraídos de las algas marinas rojas, que se encuentran en varias partes del mundo. Químicamente, las carrageninas son poligalactanos, polímeros lineales de moléculas alternadas de D-galactosa y 3,6 anhidro-D-galactosa (3,6 AG) unidas por enlaces α 1-3 y α 1-4. Las moléculas de galactosa poseen grupos sulfato y/o piruvato, encontrándose generalmente como sales de sodio, potasio o calcio. El contenido y posición de los grupos sulfatos diferencian los distintos tipos de carrageninas, los que se clasifican en cuatro tipos de importancia comercial: Kappa I, Kappa II, Iota y Lambda (http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap03/cap03_09.html).

2.16.1.-CARRAGENINA TIPO IOTA.

Las carrageninas tipo Iota es obtenida del alga marina llamada: *Euchema spinosum* que se localiza en Filipinas e Indonesia

Características.

- Posee características tixotrópicas en soluciones diluidas.
- Soluble en agua caliente.
- La adición de iones Ca^{++} induce la formación de un gel durable, elástico.
- Permite obtener un gel claro
- Insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos
- Porcentajes de uso - 0.2 a 2.0%

La carragenina tipo Iota también se une al agua, pero forma un gel seco, elástico, especialmente en la presencia de iones de calcio. La forma bivalente de este ion le ayuda a enlazar las hélices de las moléculas de carragenina. El grupo 2-sulfato en el exterior de la molécula de la carragenina tipo Iota no permite que las hélices se agreguen al mismo grado que carragenina tipo Kappa, sino forma enlaces adicionales con interacciones del calcio. Los geles son más elásticos, secos y proporcionan una excelente estabilidad

(<http://www.fmcbiopolymer.com/PopularProducts/FMCCarrageenan/DisperseandSolubilize/tabid/821/Default.aspx>)

Polimorfismo

Las carrageninas Iota en presencia de cationes, ya sean mono o bivalentes, pueden cambiar su forma cristalina.

Los cationes presentes se unen a los grupos de sulfato dentro de la molécula, de tal forma que al unir las hélices auxiliadas por las moléculas de agua, tienen la habilidad intrínseca de cristalizar por los menos cinco distintos tipos sin perder su geometría molecular, los cationes dentro de estas estructuras sirven principalmente para un balanceo entre las cargas y para una extensión inferior en la forma de polímero (Srinivas y Rengaswami)

Comportamiento Térmico

Las carrageninas tienen una gran capacidad para formar una gran variedad de geles a temperatura ambiente, no es necesaria la refrigeración, ya que los geles son estables.

La I-carragenina se gelifica termo reversiblemente en presencia de condiciones apropiadas, en solución su conformación puede ser fácilmente transformada con una fuerza iónica alta y una baja temperatura.

El mecanismo de gelificación de I-carragenina tiene una cinética de reacción de segundo orden que va acompañada con un cambio de rotación óptica.

Una de las características más notables de los geles de las carrageninas es la sensibilidad pronunciada para el ambiente iónico (Yoshiaki, et al 2002).

Degradación

Para su degradación I-carragenina adopta dos conformaciones: uno la forma del túnel abierto, para el ataque inicial del polisacárido encadena, y la otra en forma de túnel cerrado, para su progresiva degradación (Gurvan, 2003).

Mecanismo de Gelificación.

El mecanismo de conversión de una solución a gel, para carrageninas kappa e iota requiere calor y presencia de cationes para una solubilización completa. Para compensar la solubilidad lenta característica del material, se recomienda generalmente, dispersar la carragenina, con buena agitación, en el medio. En agitación continua, calentando el sistema hasta aproximadamente 82-85°C, con lo cual se asegura la solubilización completa del polisacárido.

Físicamente, la solución presentará un aumento de viscosidad, debido al desenrollamiento de las moléculas de la carragenina, con la subsecuente ligadura del hidrógeno, a las moléculas de agua en el medio. El enlace con el agua disminuye la cinética de la formación del gel en el sistema, lo que resulta en un aparente aumento en la viscosidad. Un calentamiento posterior de la solución agregará suficiente energía térmica al sistema, causando el rompimiento de la unión del hidrógeno, liberando de esta forma las moléculas de agua de nuevo en solución. Esto se demuestra por una pérdida aparente de viscosidad y normalmente asegura, la solubilización completa de la carragenina. http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap03/cap03_09.html

Los mecanismos de gelificación de las carrageninas kappa e iota, son bastante similares. El tipo kappa, durante la etapa del proceso de enfriamiento, alinea dos cadenas helicoidales similares, de tal manera, que orientan su grupo 4-sulfato, hacia cada uno. Normalmente, la fuerte negatividad de los grupos sulfato, causa repelencia a cargas similares. Esto es neutralizado, en el caso del tipo kappa, por iones de potasio. Una vez que la neutralización ocurre, una fuerte unión de hidrogeno permite la formación de la doble hélice. Esta formación helicoidal puede ser tridimensional, dando por esto, estructura al medio y sus otros ingredientes. Un enfriamiento posterior del sistema, permite una unión adicional del hidrógeno de las dobles hélices de la kappa, las cuales, a su vez, causan una “textura de gel”

aumentada y sinéresis. Esta, es la exudación de agua, de un sistema sólido. Este “endurecimiento” del gel, puede ser agravado posteriormente, por la adición de concentraciones pequeñas de iones bivalentes (caso de Ca^{++} , Mg^{++}), los cuales también causan aumento de sinéresis.

La carragenina iota va a través de un ciclo de solubilidad de manera similar al de la kappa, excepto que no hay unión posterior del hidrógeno, asociada con una estrecha proximidad de la doble hélice. Esto es debido a la pérdida del 2-sulfato adicional de la kappa, pero orientado hacia fuera, de la doble hélice de la iota. Estos grupos 2-sulfato actúan como puentes iónicos entre las hélices, por la asociación de un catión bivalente, más comúnmente de calcio. Esta estructura de gel, permite una mayor flexibilidad en la textura del producto final, que se muestra elástica. La flexibilidad de la estructura tiene una buena capacidad de retención de agua y la carragenina iota se usa en muchos sistemas de congelación-descongelación, donde retarda la asociación de la molécula de agua, la cual forma cristales de hielo de estructura fragmentada.

Como las carrageninas tienen un electrolito firme debido a que su sulfato se agrupa, este puede interactuar otros componentes como lípidos y aditivos. Además, los cationes juegan también un papel principal en el mecanismo de gelación a través de las interacciones electrostáticas http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap03/cap03_09.html

Proceso de Gelificación

El proceso para la formación de los geles es el factor más importante para el uso apropiado de carrageninas. El proceso puede ser dividido en varias áreas, incluyendo agitación, dispersión, pH, temperatura y tiempo.

Las carrageninas generalmente requieren un dispersante, un agente humectante, o medios mecánicos para su apropiada adición dentro del sistema. Esta es la parte más crítica para las carrageninas, ya que simplemente verterla en el recipiente, producirá “ojos de pescado”. Estos son aglomerados, cubiertos por goma parcialmente hidratada y son difíciles de dispersar, una vez que se forman.

Debe mantenerse la agitación constante durante el proceso para asegurar la mezcla apropiada de los componentes.

La temperatura y el tiempo del proceso deben ser mantenidos al mínimo, para reducir las posibilidades de cambios en todos los componentes. El mejor rango de pH para el comportamiento de la carragenina, esta entre 4 y 10. Las fallas en el comportamiento son aceleradas, a medida que se reduce el pH, pero hay varios métodos aplicables, para minimizar este efecto del pH http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap03/cap03_09.html.

2.17.-CARACTERISTICAS DE LOS BOLOS DE SELENIO Y SU COMPORTAMIENTO

Los comprimidos se fabrican con diferentes fuentes de Se y varios tipos de compactantes o cementos que tienen como fin mantener una liberación constante y por tiempo prolongado. Las fuentes de Se deben de ser hidrosolubles y su liberación deberá mantener un equilibrio entre su solubilidad y el efecto digestivo inducido por el liquido ruminal. Las fuentes de este elemento comúnmente usadas para la elaboración de comprimidos son selenito de sodio, selenato de calcio, selenato de bario y selenio puro o elemental (Donald, 1993).

La disponibilidad y duración del Se en el comprimido esta dada por varios factores

- a) Concentración de Se: A mayor concentración de Se en los comprimidos, se incrementa la cantidad liberada, así como el tiempo de liberación (Donald, 1993; Langlands, 1994; Gutierrez, 2006).
- b) Porosidad: entre mas poroso sea el comprimido, mayor será la liberación de Se, debido a la mayor superficie de contacto. (Donald 1993)
- c) Tamaño del grano de la fuente de Se: entre más grueso sea el grano la liberación de este elemento será mayor y por mayor tiempo (Donald, 1993; Langlands, 2003; Hunter, 1981; Peter 1981).
- d) Aglomerante: el tipo de aglomerante o cemento adhesivo utilizado en el comprimido condiciona el grado y tiempo de liberación de Se, así como la permanencia del comprimido dentro del rumen (Judson, 1988).

e) Compresión. Se ha observado que la presión impartida al comprimido trae efectos sobre su longevidad; así, comprimidos a los cuales se les ejerce compresión alta, son más efectivos que los que son sometidos a una compresión baja (Donald, 1993).

f) Depósito de sales: la formación de una cubierta de sales en la superficie de los comprimidos en el rumen, provoca baja o nula liberación de este elemento; La administración de granos de acero con los comprimidos, puede evitar los depósitos de sal (Wilkins, 1980).

g) Lubricante: La inclusión de 1% de lubricante (estereato de magnesio), tiende a incrementar la efectividad del comprimido en cuanto a liberación de Se; sin embargo la inclusión de 3 y 5% tienden a disminuir la liberación (Donald, 1993).

h) El tipo de sal de selenio que se ocupe en los comprimidos tiene que ver con la liberación de elemento, las más solubles son los selenitos, mientras que la selenometionina tiene una mejor absorción, pero en corto plazo (Hunter y Hudson 1981).

I) Incrustación. En un estudio realizado por Langlands 2003 la vida del pellet vario de 1 a 8 años, siendo su liberación afectada principalmente por el nivel de incrustación.

J) pH: Gutierrez (2006) determinó en un estudio realizado con diferentes aglomerantes, que el pH no tiene realmente un efecto significativo en la liberación del elemento.

2.18.-MANEJO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO

Con el objeto de asegurar un aporte adecuado o controlar problemas de deficiencia, se utiliza la suplementación con sales inorgánicas o compuestos orgánicos. Dentro de ellos, el selenito de sodio constituye el producto más utilizado, ya sea en conjunto con fertilizantes, esparcido sobre la pradera, por vía oral junto a una mezcla mineral, como bolos intra-ruminales o también por vía parenteral (Huerta 2006).

En México existen antecedentes que indican la presencia de forrajes con concentraciones de Se inferiores a los requerimientos para ovinos en pastoreo, así

como también con actividad deficitaria de GSH-Px. (Ramírez, 2001; Guerrero, 2000).

La estrategia de usar minerales en sales o complementos inorgánicos, óxidos, sulfatos y carbonatos, han aportado exitosamente los nutrientes requeridos para el crecimiento y la producción del ganado doméstico. Las limitaciones en la biodisponibilidad o metabolismo de las fuentes inorgánicas debidas a su forma física o química, han sido bien compensadas por sus bajos costos y amplia disponibilidad en el mercado. Sin embargo el reto permanente consiste en formular las dietas que permitan alcanzar el potencial genético de los rebaños modernos criados intensivamente; y en los años recientes ha existido una creciente comprensión de que el estatus marginal de los elementos traza representa un factor limitante sobre la salud y la productividad. Esto es debido en parte, a los importantes papeles fisiológicos de la mayoría de los elementos traza que se encuentran en los mecanismos de resistencia a las enfermedades en el organismo. Los nutricionistas han dejado de pensar en los minerales traza en términos de la simple prevención de deficiencias y por el contrario enfocan la suplementación de cantidades óptimas para la salud y la reproducción (Huerta, 2006).

3.-JUSTIFICACIÓN

Diferentes estudios relacionados con el Selenio han demostrado que las sales de selenio tienen múltiples beneficios sobre el organismo tanto productivos, reproductivos, formando parte de la enzima glutatión peroxidasa en forma principalmente de selenocisteína y aumentando su actividad aproximadamente un 20% para así cumplir su actividad antioxidante y con esto evitar el daño celular por radicales libres. Sin embargo existen diferentes formas químicas de sales de selenio (selenitos, selenatos, seleno levaduras) y de ello depende sus características de absorción digestibilidad y precio.

Existen diferentes formas de suplementación de selenio una de ellas son los bolos de liberación lenta, los cuales ayudan al manejo de la suplementación de selenio sobre todo en ganaderías bajo un sistema de producción extensivo. En México se han elaborado estos bolos de lenta liberación con diferentes matrices dentro de las cuales están las de cemento, cemento dental y yeso. Sin embargo hay que tomar en cuenta la liberación de residuos de esta matriz al animal y por consiguiente al consumidor final (humano) que podrían ser tóxicas y tener efectos nocivos para la salud. De ahí la búsqueda de nuevos materiales que cumplan con las características de liberación lenta o prolongada sin ser dañinos para la salud del animal y del consumidor un buen candidato para cumplir estos requerimientos son las carrageninas, que ya se han utilizado en fármacos de uso humano, pero no se tiene conocimiento de su comportamiento en el medio ruminal. Es importante conocer el comportamiento de bolos de carrageninas en el medio ruminal, la liberación de selenio y la biodisponibilidad de diferentes sales de selenio utilizadas y así obtener el mejor beneficio para el rumiante y el productor.

4.-OBJETIVOS

1. Comparar las concentraciones de selenio en sangre y liquido ruminal de animales tratados con bolos de selenito de sodio y selenato de bario elaborados con carrageninas administrados vía intra-ruminal y su relación con las concentraciones de selenio en liquido ruminal
2. Determinar el efecto de la administración de selenio orgánico sobre los niveles de selenio en sangre y en liquido ruminal
3. Determinar el comportamiento de los niveles de agv en función de forma de suplementación de selenio:
 - i. Selplex en premezcla
 - ii. Bolo intra-ruminal con selenito de sodio
 - iii. Bolo intra-ruminal con selanto de bario
4. Evaluar el comportamiento *in-vitro* de bolos con selenito de sodio y selenato de bario elaborados con carragenina.

5.-HIPOTESIS

- 1.- Las concentraciones de selenio en sangre y líquido ruminal aportadas por bolos de selenito de sodio y selenato de bario elaborados con carrageninas administrados vía intra-ruminal no presentara diferencias entre las dos sales
- 2.- Las concentraciones de selenio en sangre y líquido ruminal a partir de la suplementación de sales de selenio orgánico serán mayores que para el grupo testigo.
- 3.- Los niveles de AGV se verán influenciados por la suplementación de selenio en sus diferentes formas de suplementación (selenio orgánico en premezcla, Bolo intra-ruminal con selenito de sodio, Bolo intra-ruminal con selanto de bario comparado con el grupo testigo.
- 4.- Los bolos elaborados con carrageninas tendrán una vida útil de por lo menos 30 días.

6.-MATERIAL Y METODOS

El estudio se dividió en dos fases la fase *in vitro* y la fase *in vivo*, para poder determinar el comportamiento de los bolos y así administrarlos en los animales.

La fase *in vivo* se realizó en corderos y fue dividida en dos en la primera se evaluaron los bolos de matriz de carragenina con sales de selenio inorgánico (selenito de sodio y selenato de bario) y en la segunda se evaluó el uso de selenio orgánico utilizando un suplemento comercial de levaduras en el alimento (Selplex- Alltech).

La fase *in vitro* consistió en someter a los bolos de carragenina a una digestión "*in-vitro*", en condiciones de pH, temperatura y movimiento controladas en un biodigestor, con el fin de determinar su degradabilidad.

6.1.-FASE *IN VIVO* (PARTE I)

6.1.1.-LOCALIZACIÓN

Las unidades experimentales se alojaron en las instalaciones de la Unidad metabólica del Colegio de Postgraduados de Chapingo, ubicada en Montecillos, Texcoco, Estado de México.

6.1.2.-CARACTERÍSTICAS DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 12 borregos de pelo de cruzamientos comerciales, en etapa de desarrollo, con un peso promedio de 34.4 kg cada uno.

6.1.3.-MEDICINA PREVENTIVA

Todos los animales fueron desparasitados con levamisol (Parmisole 12%) dos aplicaciones en un lapso de 15 días y vacunados contra *Manhemia hemolitica*, *Clostridium chauvoei*, *C. novi*, *C. perfringens*, *C. septicum* y *C. sordelli* (Bar-vac 10 ways con restringen)

6.1.4.-IDENTIFICACION DE ANIMALES

A todos los animales se les pusieron collares con números del 1 al 12 con el fin de identificarlos y así facilitar la toma de muestras y datos.

6.1.5.-DISTRIBUCION DE TRATAMIENTOS

Los animales se distribuyeron al azar en 3 grupos: testigo, bolo con selenito de sodio y bolo con selenato de bario, cada grupo quedo conformado por 4 animales.

Grupo testigo: Se le administro un bolo intra-ruminal sin sal de selenio.

Grupo de Selenito de sodio: se le administró el bolo intra-ruminal de selenito de sodio, con un contenido equivalente a 300 mg de selenio (2%).

Grupo de selenato de bario: se le administró el bolo intra-ruminal de selenato de bario, con un contenido equivalente a 300 mg de selenio (2%).

Cuadro 9 Distribución de animales por pesos en los diferentes tratamientos

#	TESTIGO	#	SELENITO	#	SELENATO
1	36.5 kg	9	34 kg	13	33.5 kg
2	30.5 kg	10	33 kg	14	30 kg
3	32.5 kg	11	32.5 kg	15	36.5 kg
4	38.5 kg	12	37 kg	16	38.5 kg

6.1.6.-ALOJAMIENTO

Los corderos se alojaron en jaulas metabólicas individuales de metal y madera de 80 X 50 cm con comedero y bebedero con el fin de tener un mejor control de su consumo y ganancias de peso.

Las jaulas estaban instaladas en una galera techada, con el fin de proteger a los borregos de lluvias y corrientes de aire.

6.1.7.-FASE DE ADAPTACION

Los animales tuvieron una fase de adaptación de tres meses para adecuarlos a la alimentación restringida, con el fin de asegurar consumos promedios uniformes; con una dieta deficiente en Se, para uniformizar las deficiencias en los animales.

6.1.8.-CANULAS

Se utilizaron cánulas realizadas con la técnica de Cordero (2002), de Tygon de 1 pulgada de diámetro y aproximadamente 10 cm de longitud por cabo, las cuales fueron tratadas con cicloxano con el objetivo de tener una mejor adhesión.

6.1.9.-FISTULACION DE ANIMALES

Los animales fueron operados con la técnica descrita por Cabrera *et al.* (1980,1996) para caprinos y alpacas, fueron mantenidos en ayuno por 24h, tranquilizados con xilacina al 2% i.m. en dosis de 0.1 ml por 10 kg de peso vivo. La zona de abordaje, fue el punto central del triángulo del flanco izquierdo, formado por el último arco costal, el extremo de las apófisis transversas de las lumbares y la parte anterior de la pelvis. Se rasuró, desinfectó y se procedió a infiltrar localmente con Lidocaína (2%), en forma de anillo, los planos cutáneos y musculares. Los animales fueron operados en la posición de decúbito lateral derecho sobre una mesa. Una vez logrado el nivel de analgesia local, se procedió a incidir la piel con bisturí en forma de círculo de 3 cm de diámetro aproximadamente, removiendo el trozo de piel, para luego abrir los planos musculares abdominales correspondientes (oblicuo abdominal externo, oblicuo abdominal interno, transverso del abdomen) y la fascia transversa, empleando disección roma con tijeras. Se expuso el peritoneo ruminal, se procedió a su abertura, pinzando los extremos para facilitar su sutura durante la fase de síntesis de la pared abdominal. Para fijar el compartimiento ruminal a la piel en su posición definitiva, se realizó una sutura no perforante empleando hilo monocryl con puntos en “U” que traspasaban piel, peritoneo y pared del compartimiento (comprometiendo peritoneo visceral y musculatura, sin entrar a la mucosa), para luego salir atravesando peritoneo y piel nuevamente. Estas suturas se repitieron en cuatro puntos equidistantes de la incisión, cuidando de mantener la posición normal del rumen en relación con la abertura de la pared abdominal. Se completó la sutura de la zona colocando puntos intermedios en los espacios entre los primeros cuatro, hasta asegurar un cierre hermético de la pared abdominal, siempre empleando la técnica aséptica no perforante.

Completada esta etapa, se procedió a seccionar y remover la porción circular de pared ruminal que estaba delimitado por las suturas. En caso que algunas de las arterias o venas seccionadas sangraran profusamente, se procedió a su sutura empleando catgut.

Después del aseo y desinfección de la zona intervenida, se procedió a la instalación de la cánula, para lo cual su anillo interno se hace pasar por el agujero central de la misma, de manera que alrededor de la mitad de este quede expuesto al exterior y la porción que permanece aún hacia el lado interno, adquiere forma de cuña. La cánula preparada de esta manera se acomoda sobre la fístula y se procede a empujar, a través de su abertura central, el anillo interno que hace protuberancia al exterior, de esta manera, se despliega dentro de la cavidad ruminal restableciendo su forma original. Inmediatamente se procede a colocar la tapa de la cánula, obliterando su abertura. Los animales fueron tratados con antibióticos (Penicilina G i.m.) durante 5 días y al séptimo día se procedió a remover los puntos.

6.1.10.- TRATAMIENTO

Los bolos fueron puestos en una malla plástica y sujetos a la cánula ruminal con el fin de poder recuperarlos, se administraron vía cánula ruminal y se recuperaron a las 48 h post-administración.

Sin embargo del animal numero 9 no se pudo recuperar el bolo.

6.1.11.-MUESTREO DE LÍQUIDO RUMINAL

El muestreo de líquido ruminal se llevó a cabo durante 20 días cada 24 horas después de las 4 horas posteriores al suministro del alimento, para observar el comportamiento de biodisponibilidad, siendo terciados dos animales por tratamiento diariamente.

Se ocupó un matraz adicionado con un embolo con manguera de dos vías para la extracción del líquido, aproximadamente 50 ml, el cual fue filtrado en gasa doble. Se midió de inmediato el pH con un potenciómetro, para posteriormente almacenar en bolsas nazco, 20 ml en congelación. El muestreo se realizó por duplicado uno sin y otro con ácido metafosfórico al 25%, en las muestras sin ácido

metafosfórico se determinó selenio y en las muestras con ácido metafosfórico se determinaron ácidos grasos volátiles (AGVs).

6.1.12.-MUESTREO DE SANGRE

El muestreo de sangre se llevó a cabo cada 24 horas a las 8 am durante 20 días a todos los animales.

Se tomaron muestras de sangre completa mediante punción de la vena yugular, colectando las muestras por duplicado en tubos vacutainer con EDTA, que se mantuvieron en refrigeración (4°C) para su posterior análisis.

Se consideró hacer el análisis en sangre completa, por lo señalado por Maas et al; 1992, que sugieren que la sangre completa es mejor para determinar los niveles de Se, porque de existir hemólisis no se afecta el valor de Se.

6.1.13.-DIETA

La dieta que se administró a los animales fue una ración balanceada con los siguientes ingredientes y proporciones, ajustados a los requerimientos de corderos en desarrollo reportados por el NRC 2000:

Cuadro 10 Materias primas y % en la ración

INGREDIENTES	PORCENTAJE EN LA RACION
Alfalfa	33
Maíz quebrado	50
Pasta de Soya	15
Sal sin selenio	2

Cuadro 11 Contenido nutrimental:

DRY MATTER, %	88.42504
NEm, Mcal/kg	1.710775
NEg, Mcal/kg	1.09856
ME, Mcal/kg	2.617535
DE, Mcal/kg	3.192116
Crude protein, %	16.161
Rumen DIP, %	69.36353
Rumen UIP, %	30.63647
Ether extract, %	5.3687
Ash, %	6.5121
Nonstructural CHO, %	30.42936
NDF, %	33.905
ADF, %	
Calcium, %	0.5342
Phosphorus, %	0.3117
Potassium, %	1.0813
Magnesium, %	0.226
Sulfur, %	0.2249
Cobalto, ppm	0.28502

6.1.14.-MANEJO DE LA ALIMENTACION

Se alimentaron los animales individualmente, proporcionándoles 1200g de la dieta dividida en dos partes, 600 g en la mañana (7 am) y 600g en la tarde (3 pm).

Se determinó en la fase de adaptación el consumo, haciendo un promedio y así se pudo dar una alimentación restringida para asegurar el consumo uniforme por los animales.

6.1.15.-CARACTERISTICAS DE LOS BOLOS

Los bolos se fabricaron en las instalaciones del LEM-Farmacia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Campo I. El diseño de los bolos presento las siguientes características:

Longitud: 48.05 mm

Ancho 20.14 mm

Espesor: 18.36 mm

Peso: 13.7 g

Densidad: mayor a 2.12 g/ml

Concentración de selenio: 0.33g por bolo

FORMULACIÓN

Cuadro 12 SELENITO DE SODIO

INGREDIENTE	G
Selenito de sodio 45%	0.7594
Hierro reducido	5.3242
Carragenina	1.4011
Avicel	4.9735
Metocel	1.4011
Estereato de Magnesio	0.1401
Total	13.9994

Cuadro 13 SELENATO DE BARIO

INGREDIENTE	G
selenato de Bario	1.1978
Hierro reducido	5.1480
Carragenina	1.3547
Avicel	4.8093
Metocel	1.3547
Estereato de Magnesio	0.1354
Total	13.9999

Cuadro 14 PLACEBO

INGREDIENTE	G
Selenio	0
Hierro reducido	5.6290
Carragenina	1.4814
Avicel	5.2590
Metocel	1.4814
Estereato de Magnesio	0.1481
Total	13.989

6.1.16.-PESO DE LOS ANIMALES

Los animales se pesaron individualmente cada 7 días, para determinar las ganancias diarias de peso por animal y así determinar la conversión alimenticia y valorar el efecto de los tratamientos.

6.1.17.-INSTALACIONES Y EQUIPO

Para el desarrollo del experimento se contó con las instalaciones de los laboratorios del LEM-Farmacia, Química Analítica de la UNAM FES Cuautitlan e instalaciones de los módulos de investigación del Colegio de Postgraduados.

6.2.-FASE *IN VIVO* (PARTE 2)

6.2.1.-LOCALIZACIÓN

Los corderos se alojaron en las instalaciones de la unidad metabólica del Colegio de Postgraduados de Chapingo, ubicada en Montecillos, Texcoco, Estado de México.

6.2.2.-CARACTERISTICAS DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 8 borregos de pelo cruzado comercial en etapa de desarrollo con un peso promedio de 33.4 kg cada uno.

6.2.3.-MEDICINA PREVENTIVA

Todos los animales fueron desparasitados con levamisole (Parnisole 12%) dos aplicaciones en un lapso de 15 días y vacunados contra *Manhemia hemolitica*, *Clostridium chauvoei*, *C. novi*, *C. perfringens*, *C. septicum* y *C. sordelli* (Bar-vac 10 ways con restringen)

6.2.4.-IDENTIFICACION DE ANIMALES

Todos los animales se les pusieron collares con números del de 1 al 8 con el fin de identificarlos y así facilitar el manejo.

6.2.5.-DISTRIBUCION DE TRATAMIENTOS

Los animales se distribuyeron al azar en 2 grupos (testigo y Selplex) cada grupo conformado por 4 animales.

Cuadro 15 Distribución de animales por pesos en los diferentes tratamientos (testigo y selplex)

#	TESTIGO	#	SELPLEX
1	36.5 kg	5	34 kg
2	30.5 kg	6	33.5 kg
3	32.5 kg	7	37 kg
4	38.5 kg	8	31.5 kg

El alojamiento, fase de adaptación, cánulas, fistulación, muestreo de líquido ruminal, muestreo de sangre, dieta, manejo de la alimentación y peso de los animales fueron bajo las mismas condiciones que en la fase uno

6.2.6.- FORMA DE ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO

Grupo testigo: recibió la misma dieta y manejo que el grupo suplementado con selplex, pero sin recibir ningún aporte de selenio.

Grupo con sal de Selenio orgánico: Se administró individualmente según las recomendaciones del fabricante por vía oral mañana y tarde, la dosis de selenio orgánico (0.15 g por comida) como selplex (Alltech).

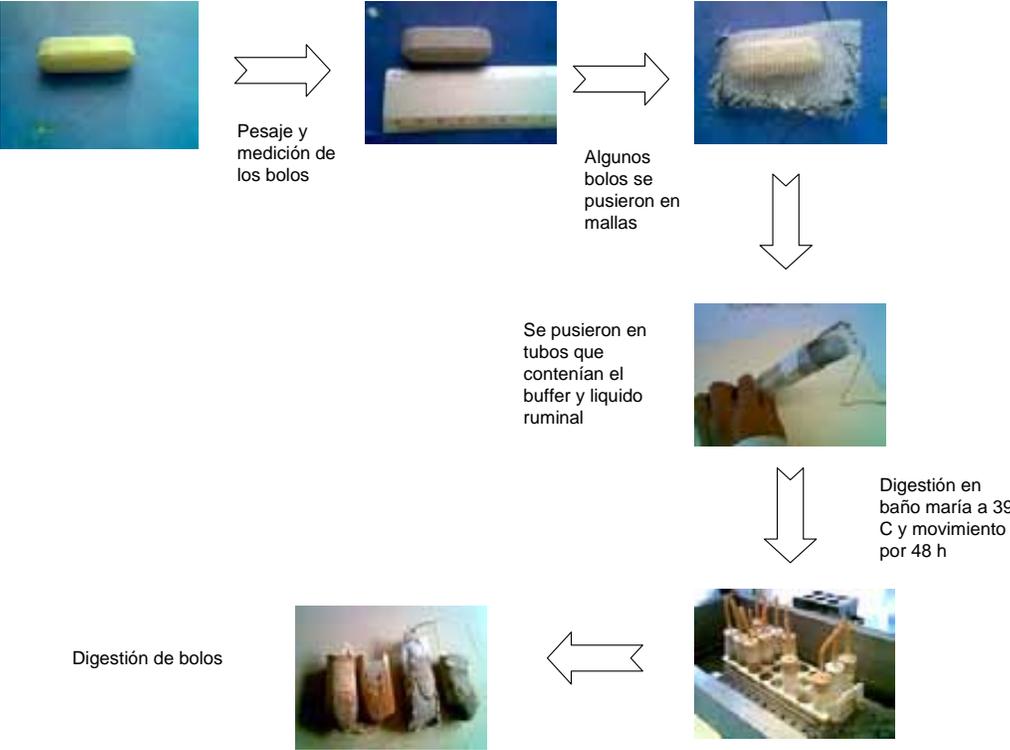
6.3.-FASE *IN VITRO*

En esta fase se utilizó la digestión in vitro de forrajes, utilizada en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM

Procedimiento:

- a) Los bolos se pesaron y midieron
- b) Algunos bolos fueron puestos en mallas plásticas para observar el comportamiento con estas (tal como se colocaron en el rumen).
- c) Se introdujeron en tubos plástico con el buffer, líquido ruminal y CO₂
- d) Se pusieron en un baño maría a 40 C con movimiento durante 48 h
- e) Se sacaron y se metieron en una estufa durante 48h
- f) Se pesaron

Figura 1 Procedimiento de la evaluación in Vitro de los bolos intra-ruminales



7.-PLANTEAMIENTO ESTADÍSTICO

Parte I

Se realizó un diseño completamente al azar de un factor con tres niveles

Factor de estudio: tipo de sal de selenio

Las variables de respuesta (variables dependientes)

- a) Cambios de peso vivo
- b) Concentración de selenio en líquido ruminal
- c) Concentración de selenio en sangre
- d) Niveles de AGVS
- e) Degradación del bolo de carragenina

Variables independientes

- a) Selenito de sodio
- b) Selenato de bario
- c) Sin Selenio

Parte II

Se realizó un diseño completamente al azar de un factor con 2 niveles

Factor de estudio: tipo de sal de selenio

Las variables de respuesta (variables dependientes)

- a) Cambios de peso vivo
- b) Concentración de selenio en líquido ruminal
- c) Concentración de selenio en sangre
- d) Niveles de AGVS

Variables independientes

- a) Selenio orgánico
- b) Sin Selenio

8.-METODOS

8.1.-DETERMINACION DE SELENIO EN SANGRE Y LÍQUIDO RUMINAL

8.1.1.-ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

La elección del método analítico depende principalmente del tipo de fluido biológico que se elija y del analito, en éste caso para la cuantificación de selenio se eligió la Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con generación de hidruros, debido a que es una técnica muy sensible y específica, capaz de analizar cualitativamente y cuantitativamente metales, desde trazas hasta altos niveles, puede analizar 67 elementos de la tabla periódica, siendo la más empleada para estas determinaciones.

El principio de la EAA es que los átomos en estado basal son capaces de absorber energía a longitudes de onda específicas, por lo que la cantidad de energía que absorben es proporcional a la cantidad de analito en la muestra. En ésta existen diferentes mecanismos de atomización como son: flama, sistema de mercurio por vapor frío, horno de grafito y generación de hidruros.

El sistema de generación de hidruros fue el que se utilizó en este proyecto, se produce en las muestras una reacción en un sistema externo con un agente reductor usualmente boro hidruro de sodio. Los productos de reacción gaseosa acarrean la muestra a la celda, en la trayectoria de la luz del EAA. Dicha reacción no produce átomos libres pero si hidruros volátiles. Esta especie molecular no es capaz de causar absorción atómica. Para disociar el hidruro en átomos libres, la muestra en la celda debe ser calentada. En algunos sistemas de hidruros en la absorción, la celda es montada sobre el horno del espectrofotómetro y la celda es calentada por una flama de aire-acetileno (como en el caso del presente proyecto) y en otros casos la celda es calentada eléctricamente.

En cualquiera de los casos el gas hidruro es disociado en la celda caliente a átomos libres y la aplicación de energía da como resultado la excitación de los átomos, provocando el desprendimiento de energía de los átomos y finaliza con el decaimiento de éstos y el átomo regresa a su estado basal.

Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar selenio en diferentes tipos de muestras, como fluidos biológicos, tejidos y alimento. En el generador de hidruros, el boro hidruro de sodio (NaBH_4) es utilizado como agente reductor para reaccionar con Se 6(VI) y obtener una especie de hidruro de Selenio (H_2Se).

Muestras biológicas.

- Sangre de borregos de pelo cruzado Pelibuey
- Líquido intra-ruminal de borregos de pelo cruzado Pelibuey.

Tratamiento de las muestras.

Digestión ácida en horno de microondas.

- 1.- sangre completa o líquido ruminal
- 2.- Se pesaron 0.5g de muestra +/- 0.05g directamente en el vaso del horno de microondas
- 3.- Se adicionaron: 5ml de agua desionizada, 2.5 ml de ácido nítrico concentrado y 1ml de peróxido de hidrógeno al 30%
- 4.- Se dejó reposar
- 5.- Se somete a digestión ácida en el horno de microondas, con el método de sangre Se_2 que está cargado en el horno

Condiciones de operación del método.

Cuadro 16 Condiciones de digestión ácida para sangre.

Etapas	Potencia (W)	Potencia %	Rampa (min)	Presión	Temperatura (°C)	Tiempo de mantenimiento
1	1200	100	4	350	140	2 min
2	1200	100	2	350	180	4 min
3	1200	100	2	350	200	4 min

Cuadro 17 Condiciones de digestión ácida para líquido ruminal

Etapas	Potencia (W)	Potencia %	Rampa (min)	Presión	Temperatura (°C)	Tiempo de mantenimiento
1	1200	100	5	350	120	2 min
2	1200	100	5	350	170	5 min

Una vez terminado el proceso de digestión ácida en el horno de microondas:

- Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente.
- Las muestras digeridas se vierten en matraces de 25 ml, enjuagando los vasos con ácido clorhídrico 7 M.
- Llevar a la marca de aforo, con ácido clorhídrico 7 M.
- Trasvasar los matraces a frascos de pvc, previamente etiquetados.
- Las muestras pueden ser analizadas por EAA ese mismo día o hasta 2 días después.

8.2.-DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

8.2.1.-CROMATOGRAFÍA DE GASES

La determinación de los ácidos grasos volátiles se realiza, mediante cromatografía en fase gaseosa (GC)

Cuadro 18 Características de equipo de cromatografía de gases

Method	Syringe injection
Description	FID
Column	DB-S Megabore 30m, 0.25, film 0.25
Carrier	Nitrogeno a 5 PSI

Reactivos

Ácido metafosfórico 25% peso/volumen.

Se Pesaron 25g de ácido metafosfórico, se disolvieron en 50ml de agua y aforaron en un matraz volumétrico a 100ml con agua desionizada.

El muestreo del liquido ruminal se realizó 6 h después de ofrecer el alimento y paralelo a la determinación del pH, se colectó una muestra de liquido ruminal (5ml), que se puso en congelación inmediatamente después de terminar el muestreo hasta el momento del análisis de las muestras.

Procedimiento

Para procesar las muestras:

- 1) Se descongelaron y se centrifugaron a 2500 rpm durante 30 min.

- 2) Se colectó una muestra del sobrenadante (20ml).
- 3) Se adicionaron 4 ml de ácido metafosfórico.
- 4) Se refrigeró a 4 C durante 4 h.
- 5) Se centrifugó a 2500 rpm durante 30min.
- 6) Se separó el sobrenadante en tubos diferentes o viales con la finalidad de evitar que se vuelva a contaminar.
- 7) Se Inyectó en el cromatógrafo de gases aproximadamente 1 µl con una jeringa Hamilton
- 8) Se calibró el cromatógrafo con un estándar.

Preparación del estándar externo:

- 1) Se adicionaron las siguientes cantidades a un matraz volumétrico:

Cuadro 19 Preparación del estándar externo de ácidos grasos volátiles

AGV	g/L	mM	PM	mM
Acético	3.7500	62.50	60.0	50.0
Propionico	1.3875	18.75	74.0	15.0
Isobutírico	0.5506	6.25	88.1	5.0
Butírico	1.1013	12.50	88.1	10.0
Isovalerico	0.5105	5.00	102.1	4.0
Valerico	0.5105	5.0	102.1	4.0

- 2) Se aforó a un litro con agua bidestilada.

Estándar de trabajo: Se adicionaron 2ml de ácido metafosfórico al 25%, a 8 ml del stock de trabajo, se mezclaron y transfirieron a viales.

8.3.-DIGESTIBILIDAD IN VITRO

Material

Molino, Pipeta automática para soluciones amortiguadora, inoculo, tubos de centrifuga de polietileno de 120mm X 40 mm de diámetro tapados con tapones

con válvula Bunsen acondicionada, baño de agua con agitación, centrifuga con cabezal apropiado p/ tubos empleados

Reactivos

1) Solución amortiguadora de McDougall

Solución 1:

Na₂HPO₄ anhidrido 3.7 (fosfato de sodio dibasico anhidro)

NaHCO₃ 9.8 (bicarbonato de sodio)

Agua desionizada a 40C 1 lit

Solución 2

NaCl 4.7g

KCl 5.7

CaCl₂ 0.4

MgCl₂ 0.6

Agua destilada 100ml

La solución amortiguadora se prepara agregando 10 ml de la solución 2 a 1 lit de la solución 1, se agita la mezcla con agitador durante 15 min durante ese tiempo se le burbujea CO₂.

2) Inoculante

Obtener el contenido ruminal de animales fistulados alimentados con una mezcla de 50:50 de alfalfa y un pasto fibroso (panizo o grama rhodes) han sido efectivos.

Conservar el líquido ruminal caliente a 39 grados centígrados, tapado t gaseado con CO₂ (una mezcla de ácido sulfúrico y carbonato) licuarlo por dos minutos y filtrar rápidamente a través de gasa recogiendo en un matraz precalentado, adicionar 250ml de líquido por cada litro de amortiguador a 40 grados centígrados.

Agitar para que no se asienten partículas

3) pesado de los bolos

4) inoculación. Adicionarle a cada tubo 25ml de amortiguador-inoculo, tapar los tubos con las válvulas Busen.

5) Incubar los tubos en el baño a 39 grados centígrados por 48 horas, agitar los tubos durante las primeras 6 horas de la incubación

- 6) Peso de los bolos digeridos.
- 7) diferencia de peso y volumen.

8.4.-CONCENTRACION DE SELENIO EN SANGRE Y LIQUIDO RUMINAL

Curva de calibración

La cuantificación de selenio en sangre y líquido ruminal se realizó mediante una curva de calibración de selenio para ambos fluidos.

La curva de calibración se preparó en un rango de concentración de 0 a 18 µg/L de Selenio, la cual fue preparada de la siguiente manera:

- a) Del estándar de Selenio de alta pureza se tomaron 50 µL.
- b) El volumen tomado se vació en un matraz volumétrico de 25 mL llevándose a la marca de aforo con agua desionizada a esta solución le llamamos solución patrón.
- c) De la solución anterior se tomaron alícuotas que se muestran en la tabla 20 para preparar las diferentes concentraciones de la curva de calibración:

Cuadro 20 Datos de la curva de calibración EAA. De la solución patrón se tomaron los volúmenes indicados y la concentración de la solución final esta en la columna central.

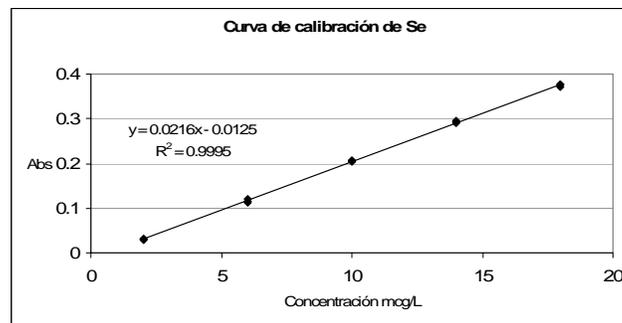
SISTEMA	CONCENTRACIÓN (µg/L)	VOLUMEN de la solución patrón (µL)
1	2	50
2	6	150
3	10	250
4	14	350
5	18	450

- d) Los volúmenes se colocaron en matraces de 50 mL y se llevaron a la marca de aforo con ácido clorhídrico 7M.
- e) Las soluciones anteriores se analizaron con EAA con sistema de atomización de generador de hidruros marca Varian modelo (¿).

Cuadro 21 Resultados de la lectura por EAA de las soluciones de la curva de calibración.

Sistema	Concentración (µg/L)	Abs
1	2	0.0277
1	2	0.0319
1	2	0.0309
2	6	0.1127
2	6	0.1163
2	6	0.1191
3	10	0.203
3	10	0.2058
3	10	0.2078
4	14	0.29
4	14	0.2936
4	14	0.2948
5	18	0.3711
5	18	0.3752
5	18	0.3763

Grafica 1 Curva de calibración obtenida (Regresión lineal del sistema).



El modelo lineal que permitió la estimación de las concentraciones en las muestras de sangre y de líquido ruminal fué el siguiente:

$$\text{Abs} = 0.0216 (\text{Concentración}) - 0.0125$$

Los parámetros obtenidos en la regresión se muestran en la siguiente tabla:

Cuadro 22 Parámetros estadísticos de la regresión lineal (EAA)

PARAMETRO	VALOR
Pendiente (m)	0.0216
Intervalo de confianza al 95% de la pendiente	-0.0213 a - 0.0219
Intervalo de confianza al 95% del intercepto	0.0160 a 0.0090
Intercepto (b)	-0.0125
Coefficiente de correlación ®	0.9995
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9990

De acuerdo a los datos anteriores observamos que el coeficiente de determinación explica el 99.90% de la variación en la absorbancia, por los cambios en la concentración de selenio y que el valor del coeficiente de correlación implica una fuerte relación entre la concentración y la absorbancia del selenio.

9.-RESULTADOS

9.1.-CONCENTRACION DE SELENIO EN LÍQUIDO RUMINAL (PARTE I)

La liberación de Selenio en el rumen al inicio del experimento fue elevada para el grupo de selenito de sodio, después fue decreciendo su concentración hasta el día diez en el cual tuvo una subida drástica, y posteriormente un decremento paulatino hasta el día diecisiete. En este grupo se encontraron los niveles máximos de concentración de selenio en líquido ruminal (10,84 ppm) comparados con los otros grupos (Placebo y selenato de bario). Existieron diferencias en cuanto a concentración de selenio en líquido ruminal en los días 11, 13 y 15 contra el testigo y se encontró una diferencia con el grupo de selenato de bario el día 13 ($p < 0.05$).

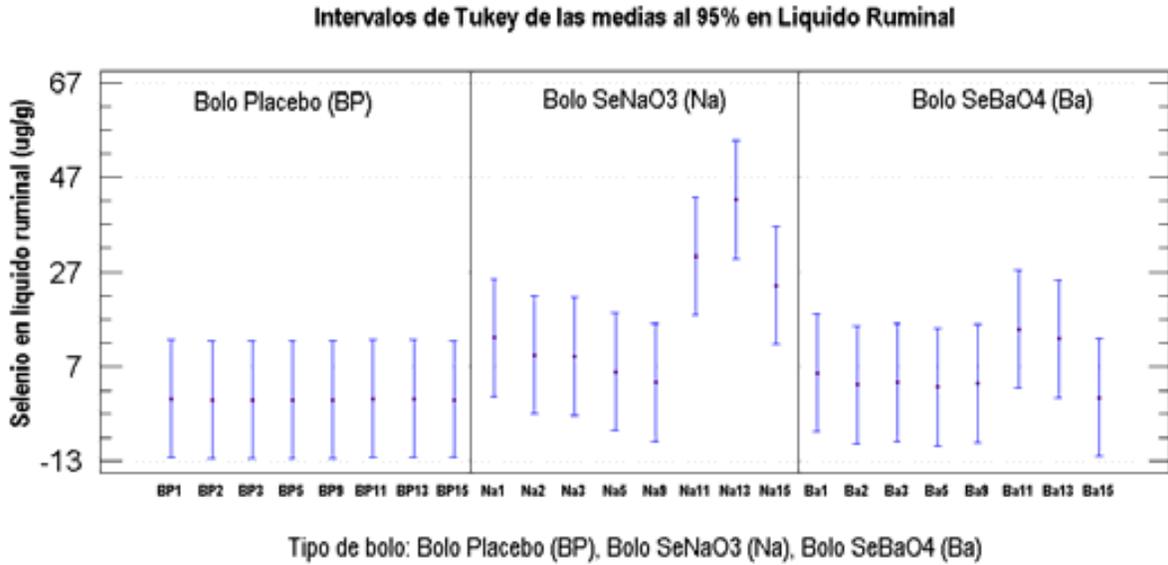
Para el grupo de selenato de bario se observó un incremento al inicio del estudio, menor al grupo de selenito de sodio, pero mayor al testigo, sin existir diferencias entre grupos. Para el día 8 de muestreo se presentó un incremento en la concentración, ocurriendo la máxima concentración el día 11, declinando el día 15 a niveles basales.

Los descensos de concentración de Selenio que se presentaron en los primeros días se debieron a que el bolo se retiró a las 48 h post- administración ya que se presentaron sinologías de intoxicación.

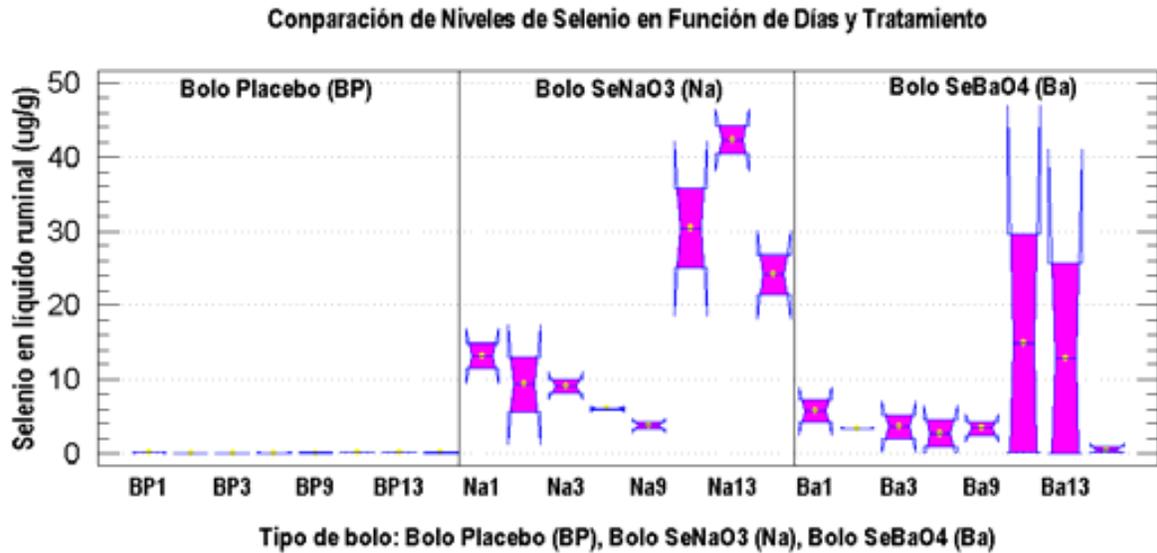
Cuadro 23 Datos del análisis de varianza de los intervalos de Tukey de las medias al 95% en líquido ruminal (parte I)

Análisis de varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados de medias	F-Radio	P-valor
Entre grupos	5427.74	23	235.989	6.32	0.00001
Dentro de los grupos	896.804	24	37.3668		
Total	6324.54	47			

Grafica 2 Intervalos de Tukey de las medias al 95% en líquido ruminal (parte I)



Grafica 3 Comparación de niveles de selenio en función de días y tratamiento en líquido ruminal (Kruskall-Wallis) (parte I)



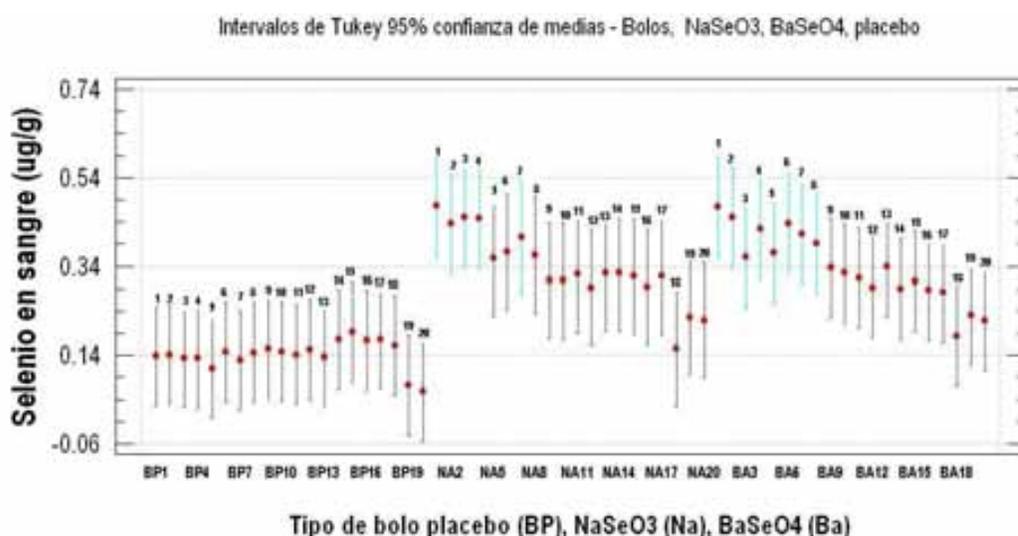
Test statistic = 39.1735 P-Value = 0.0189882

Como se observa en la grafica anterior existió una gran variabilidad, por eso se optó por hacer la prueba de Kruskal-Wallis para hacer la comparación de medianas, pero no se encontraron diferencias entre tratamientos por día de muestreo.

9.2.-CONCENTRACIONES DE SELENIO EN SANGRE (PARTE I)

Las concentraciones de selenio en sangre para los grupos suplementados con sales de selenio inorgánico aumentaron significativamente en el día 1 de muestreo posterior a la suplementación, siendo superiores a las encontradas para el grupo testigo, manteniéndose hasta el día 20 de muestreo para las dos formulaciones, presentándose un descenso paulatino en el transcurso del tiempo.

Grafica 4 Intervalos de Tukey 95% confianza de medias para concentraciones de selenio en sangre por tratamiento y día (parte I)



Cuadro 24 Datos del análisis de varianza de los intervalos de Tukey de las medias al 95% en sangre (Parte I)

Análisis de varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados de medias	F-Radio	P-valor
Entre grupos	3.0055	59	0.0509407	8.69	0.00001
Dentro de los grupos	0.961766	164	0.00586443		
Total	3.96727	223			

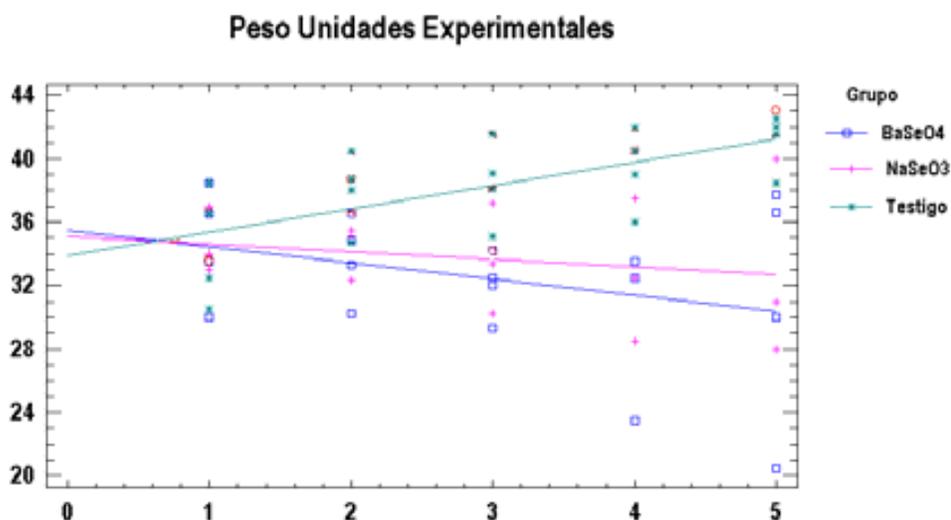
Con los bolos de selenito de sodio existió una diferencia significativa en los días 1-4 y 7 contra el testigo $P < 0.05$ sin presentar diferencias contra el grupo de selenato de bario, el grupo de selenato de bario presentó diferencia en los días 1-8 con respecto al testigo $P < 0.05$ sin presentar diferencias contra el selenito de sodio.

9.3.-PESOS (PARTE I)

Las medias entre tratamientos se obtuvieron mayores pesos promedio para el grupo testigo comparado con los animales suplementados con sales de selenio inorgánico.

La ganancia diaria de peso para el tratamiento placebo mostró una curva ascendente, mientras que los tratamientos de selenito y selenato tuvieron un comportamiento descendente como se puede observar en la grafica 5 de ganancias de peso en el transcurso del tiempo.

Grafica 5 Comportamiento de los pesos en el transcurso del tiempo (parte I)



Los pesos obtenidos en este estudio tuvieron diferencias entre los tratamientos testigo contra selenato ($p < 0.05$), siendo mejores los pesos del testigo, los tratamientos de selenito y selenato no mostraron diferencias entre ellos, ni tampoco selenito con el testigo.

9.4.- ANALISIS DE SELENOSIS

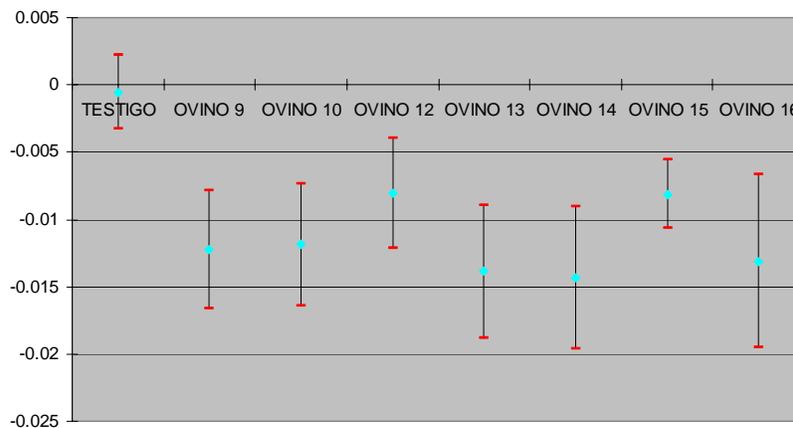
Un animal murió en el transcurso del experimento (animal 11) del grupo de selenito de sodio, tuvo valores promedio de concentración de selenio en sangre de 0.471 ppm.

Se observó depresión en el consumo, cuando los valores sanguíneos promedio de selenio alcanzaron 0.414 ppm.

Cuadro 25 Concentraciones promedio de selenio por grupo (parte I)

DIAS	TESTIGO	SELENITO	SELENATO	INHIBICION DEL CONSUMO
1-5	0.132	0.360	0.366	66.66 %
6-9	0.144	0.376	0.402	50.00%
10-21	0.143	0.284	0.283	33.33%

Grafica 6 Comparación de la pendiente de concentración de selenio en sangre por individuo para los tratamientos selenito y selenato (parte I)



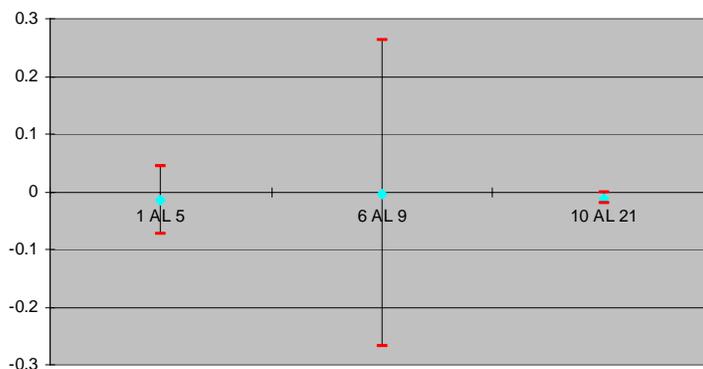
Cuadro 26 Concentraciones de selenio en sangre de animales testigo

TESTIGO				
DIAS	OVINO 1	OVINO 2	OVINO 3	OVINO 4
1 al 5	0.139	0.136	0.134	0.119
6 al 9	0.143	0.149	0.137	0.147
10 al 21	0.144	0.144	0.150	0.134
PROMEDIO	0.142	0.143	0.144	0.133

Cuadro 27 Concentraciones de selenio en sangre de animales tratados con selenito

SELENITO				
DIAS	ovino 9	Ovino 10	ovino 11	ovino 12
1 al 5	0.323	0.402	0.471	0.355
6 al 9	0.227	0.497	0.000	0.403
10 al 21	0.172	0.360	0.000	0.319
PROMEDIO	0.219	0.396	0.471	0.344

Grafica 7 Comparación de pendientes de concentración de selenio en sangre en las diferentes fases para selenito

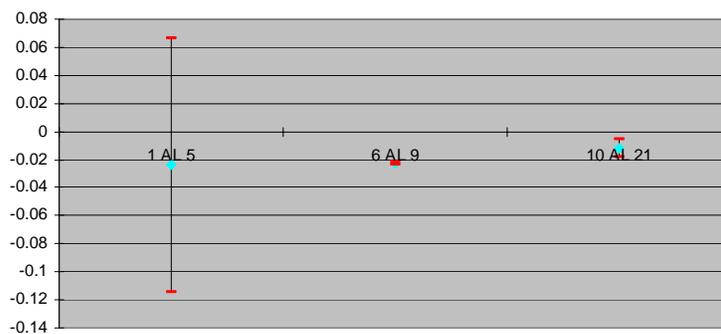


Como se puede observar en la grafica 8 existió una gran variación en la concentración de selenio en sangre en los días 6-9, opuesto a lo ocurrido en el tratamiento con selenato de bario en el cual la mayor variación fue observada en los primeros días de muestreo (1-5).

Cuadro 28 Concentraciones de selenio en sangre para selenato

SELENATO				
DIAS	ovino 13	Ovino 14	ovino 15	ovino 16
1 al 5	0.375	0.406	0.304	0.379
6 al 9	0.355	0.474	0.270	0.509
10 al 21	0.260	0.318	0.231	0.325
PROMEDIO	0.305	0.368	0.256	0.373

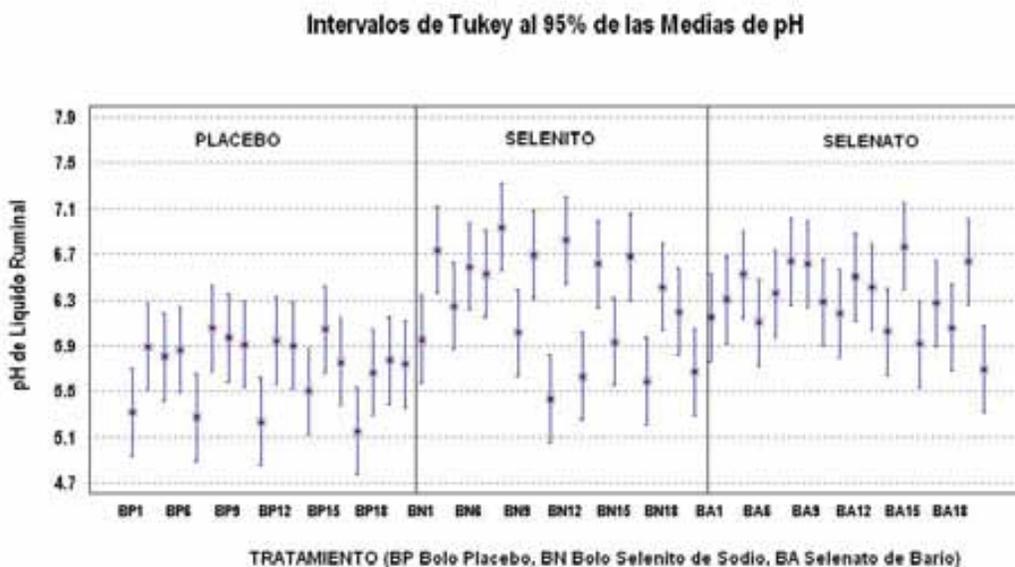
Grafica 8 Comparación de pendientes de concentración de selenio en sangre en las diferentes fases para selenato



9.5.-RESULTADOS DE pH RUMINAL (PARTE I)

Los resultados de pH muestran una diferencia numérica entre los tratamientos testigo contra selenito y selenato tendiendo a la neutralidad estos últimos.

Grafica 9 Comparación de medias para el pH para los tratamientos (testigo, selenito y selenato) (Parte I)



Cuadro 29 Análisis de varianza para la Comparación de medias para el pH para los tratamientos (testigo, selenito y selenato) (parte I)

Análisis de varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados de medias	F-Radio	P-valor
Entre grupos	21.15	53	0.39	2.77	0.0001
Dentro de los grupos	7.78	54	0.14		
Total	28.93	107			

Cuadro 30 pH promedio por tratamiento (parte I)

	Placebo	selenito	selenato
	5,68	5,87	6,20
	5,53	6,54	6,66
	6,36	6,65	6,17
promedio	5,99	6,35	6,30

No se encontró efecto sobre el pH ruminal por la suplementación con selenio inorgánico.

9.6.-RESULTADOS DE LA PRUEBA *IN VITRO*

Cuadro 31 Peso de los bolos en la prueba in-vitro

RED	BOLO	PESO INICIAL	PESO FINAL	DEGRADACIÓN
No	Selenato 1	13.16	16.38	-3.21
Si	Selenato 2	13.42	14.79	-1.36
Si	Selenato 3	13.81	16.29	-2.47
Si	Selenito 1	14.01	17.4	-2.38
No	Selenito 2	13.96	20.32	-6.35
No	Selenito 3	13.95	18.10	-4.14
No	Testigo 1	12.98	15.95	-2.97
No	Testigo 2	13.39	16.62	-3.23
No	Testigo 3	12.89	16.12	-3.23
No	Testigo 4	13.04	16.97	-3.93

Para los bolos con red y en suspensión se obtuvieron los siguientes resultados en degradación: – 1.36, -2.47, y -2.38.

Figura 3 Bolo con malla (sin expansion)



No se observó adhesión alguna en las paredes, ni expansión, ni porosidad en la matriz del bolo, que se metieron en la malla.

Para los bolos que no se metieron en red y que cayeron al fondo, se observó adhesión a la pared, expansión, porosidad y aumento de peso. Como se puede observar en la tabla 33.

Figura 4 bolos sin maya (con expansion)



La degradación fue la siguiente: -3.21, -6.35, -4.14, -2.97, -3.23, -3.23, -3.93.

9.7.-CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES

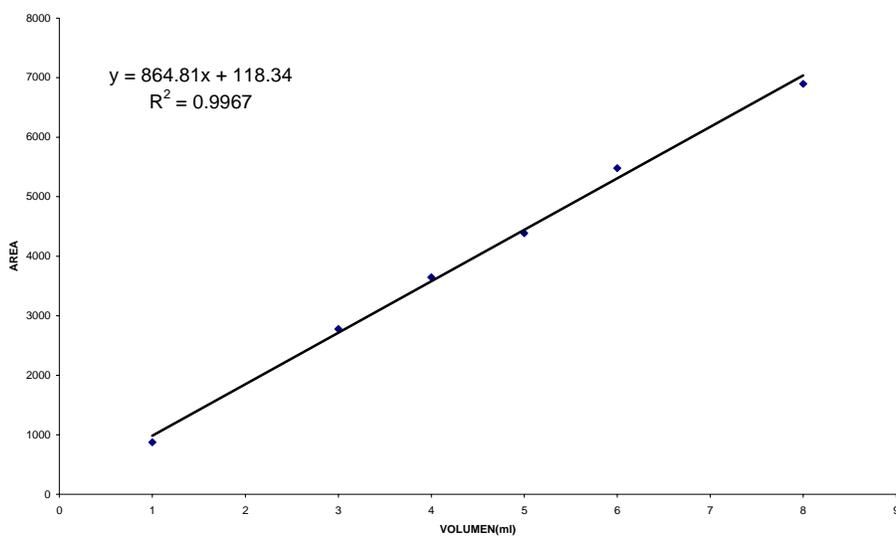
Curva de calibración

La cuantificación de ácidos grasos volátiles obtenidos del líquido ruminal se realizó mediante una curva de calibración de ácidos grasos volátiles (Acético, propionico y butírico)

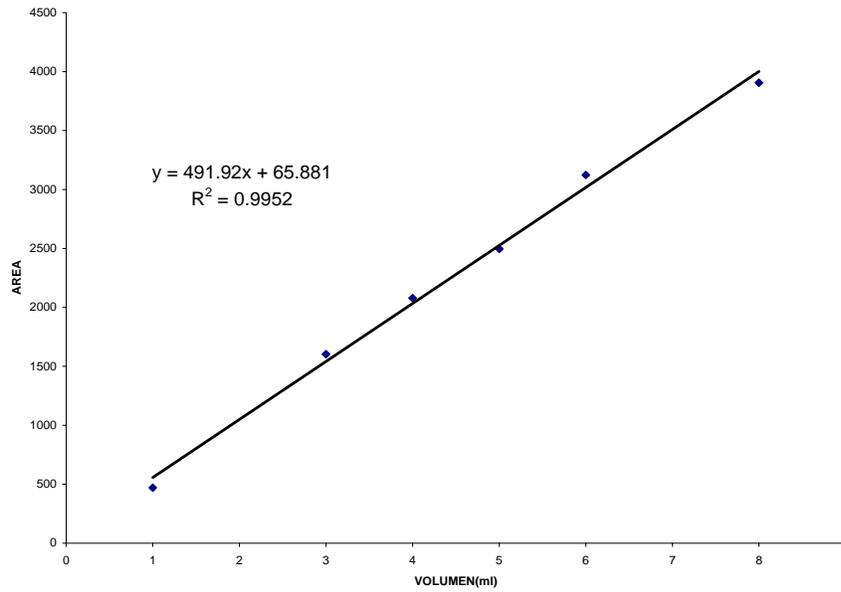
Cuadro 32 Datos de curva de calibración en la determinación de ácidos grasos volátiles

SISTEMA	Vol. Sta (ml)	Vol Metafosforico	Aforo
1	1	2	10
2	3	2	10
3	4	2	10
4	5	2	10
5	6	2	10
6	8	2	10

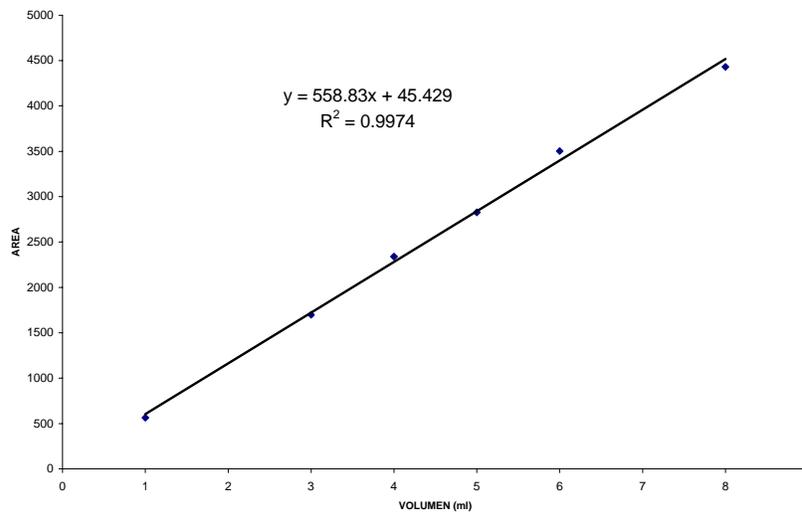
Grafica 10 curva de calibración para Acético



Grafica 11 curva de calibración para Propionico



Grafica 12 curva de calibración para Butírico



Siendo las R^2 0.9967, 0.9952 y 0.9974 (A, P, B) grafica 13,14 y 15 respectivamente

Cuadro 33 Constantes del cromatógrafo para la cuantificación de Acético, propionico y butírico.

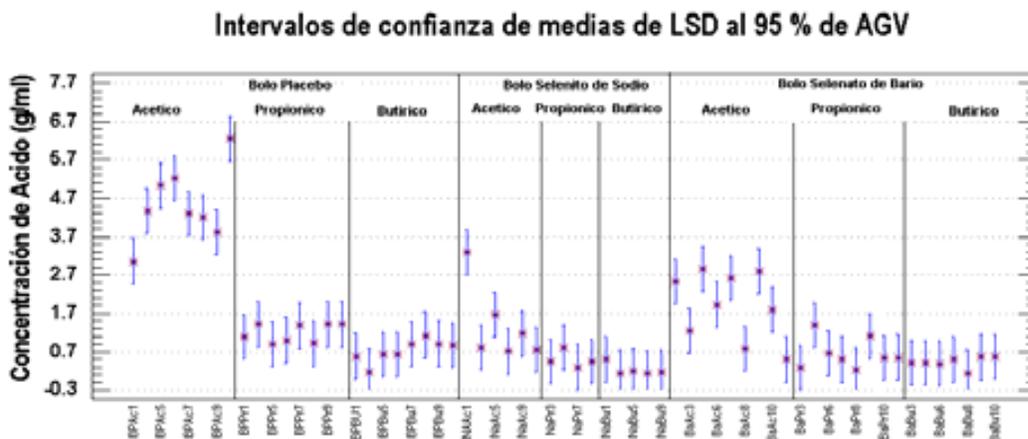
Init Tem	Hold	Ramp	Final Temp
100	0.00	10.00	2.20
220	8.00	0.00	0.00

9.7.1.-CONCENTRACIONES DE ACIDO GRASOS VOLATILES (PARTE I)

Las concentraciones entre los tratamientos para ácido acético fueron superiores para el grupo testigo, comparado con los grupos suplementados con sales de selenio inorgánico con diferencia significativa ($p < 0.05$)

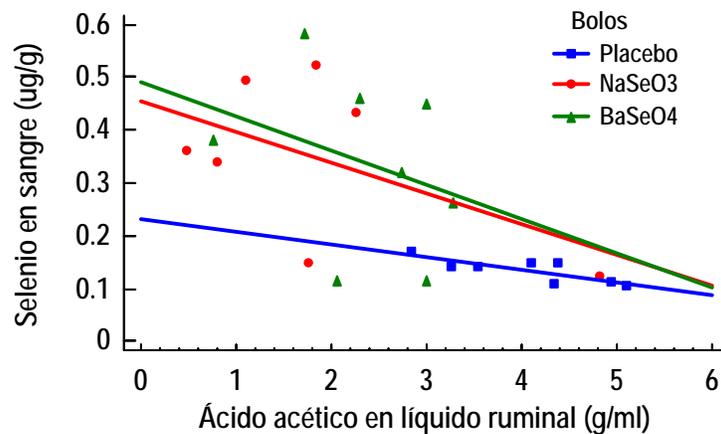
En las concentraciones de ácido propiónico y ácido butírico no se observaron diferencias entre grupos.

Grafica 13 Intervalos de confianza de medias de LSD al 95% de AGV (parte I)



9.7.2.- CORRELACIONES ENTRE RESPUESTAS (PARTE I)

Grafica 14 Correlación de la concentración de Se en sangre y Concentración de Acético en liquido ruminal por tratamiento (parte I)

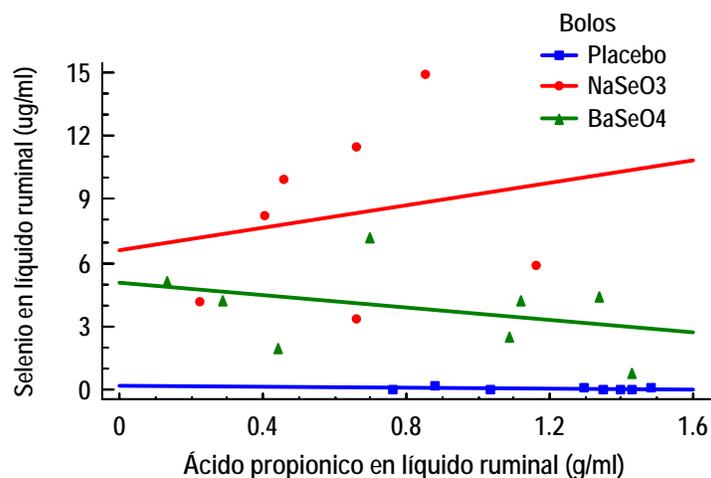


Cuadro 34 Valores de r cuadrada en la Correlación de la concentración de Se en sangre y Concentración de Acético en liquido ruminal por tratamiento (parte I)

TRATAMIENTO	% DE "R" CUADRADA
PLACEBO	62.79
SELENITO	29.01
SELENATO	10.51

Como se puede observar en la grafica existe una tendencia negativa con respecto a la concentración de selenio en sangre y la concentración de ácido acético en líquido ruminal, teniendo una correlación más fuerte el grupo placebo.

Grafica 15 Correlación en la Concentración de Se en líquido ruminal y Concentración de Acido Propiónico en líquido ruminal por tratamiento (parte I)

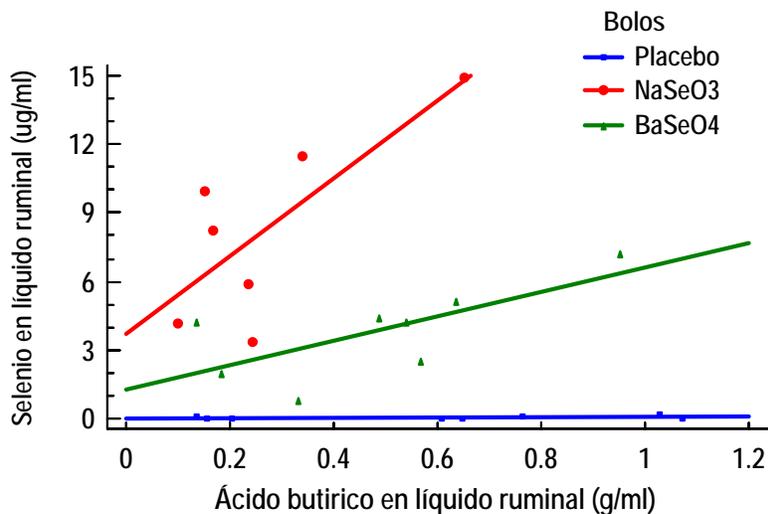


Cuadro 35 Valores de r cuadrada en la Correlación en la Concentración de Se en líquido ruminal y Concentración de Acido Propiónico en líquido ruminal por tratamiento (parte I)

TRATAMIENTO	% DE "R" CUADRADA
PLACEBO	19.71
SELENITO	3.94
SELENATO	13.15

En cuanto a la concentración de selenio en líquido ruminal con respecto a la concentración de ácido propiónico en rumen, se observó una tendencia positiva en el grupo de selenito de sodio y una tendencia negativa para el grupo de selenato de bario, sin existir un efecto en el tratamiento placebo.

Grafica 16 Correlación en la Concentración de Se en líquido ruminal y la Concentración de Ácido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (parte I)

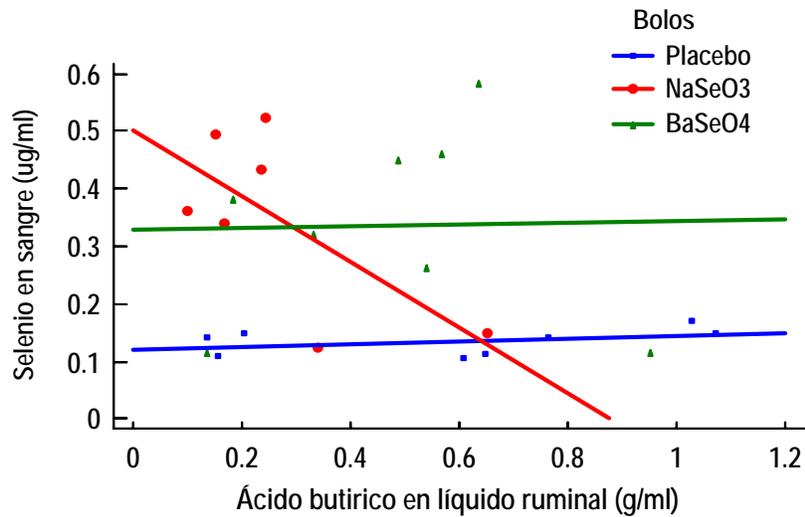


Cuadro 36 Valores de r cuadrada en la Correlación en la Concentración de Se en líquido ruminal y Concentración de Ácido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (parte I)

TRATAMIENTO	% DE "R" CUADRADA
PLACEBO	24.85
SELENITO	56.75
SELENATO	49.02

Para las concentraciones de selenio en líquido ruminal con la concentración de ácido butírico existe una tendencia positiva para el grupo de selenito de sodio y selenato de bario, sin existir algún efecto en el grupo placebo.

Grafica 17 Correlación en la concentración de Se en sangre y Concentración de Acido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (parte I)



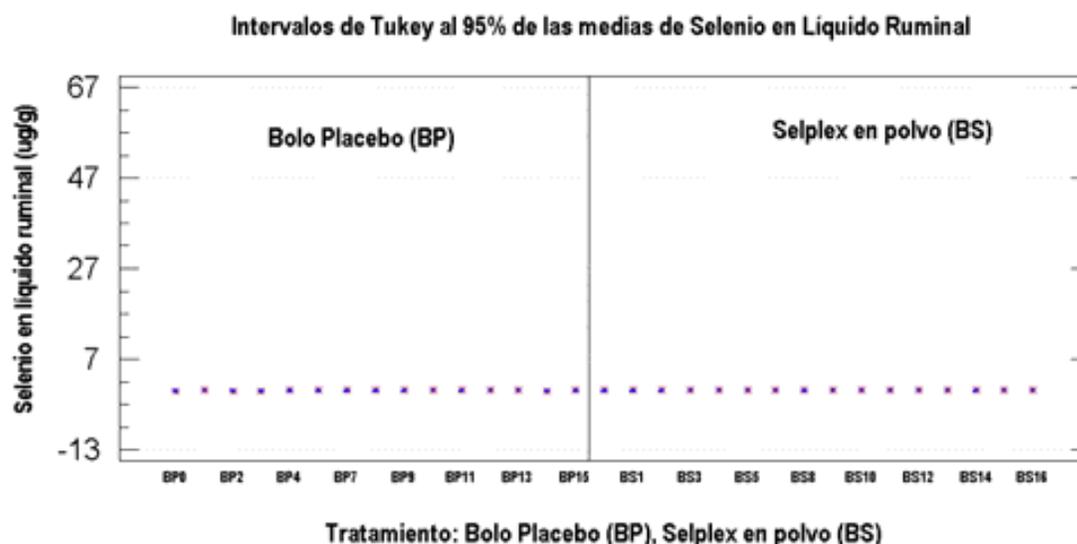
Cuadro 37 Valores de las r cuadradas en la 17 Correlación en la concentración de Se en sangre y Concentración de Acido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (parte I)

TRATAMIENTO	% DE "R" CUADRADA
PLACEBO	15.11
SELENITO	45.37
SELENATO	0.05

9.8.-CONCENTRACION DE SELENIO EN LÍQUIDO RUMINAL (PARTE II)

El comportamiento de concentración de selenio en líquido ruminal para el grupo testigo y selplex no mostró una diferencia significativa entre tratamientos.

Grafica 18 Intervalos de Tukey al 95% de las medias de selenio en líquido ruminal (parte II)



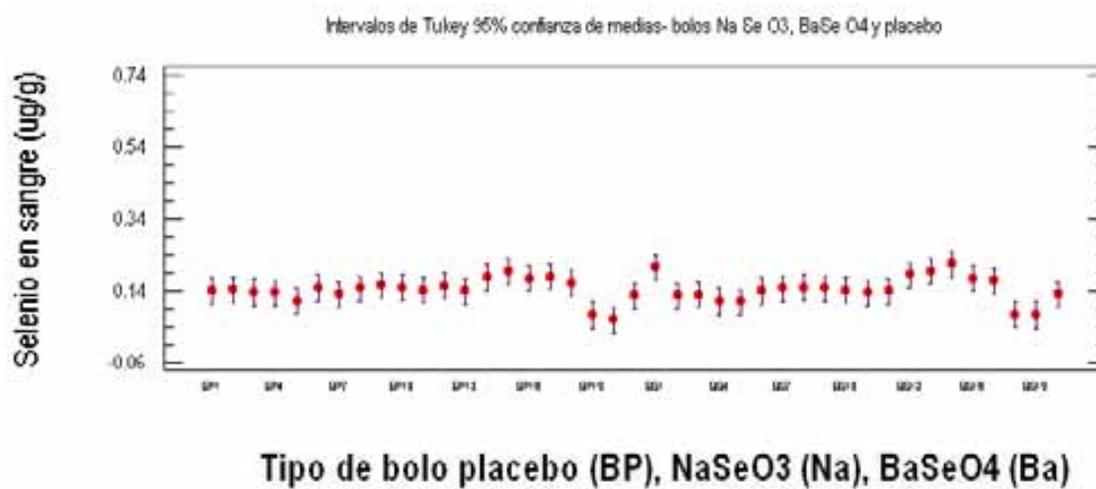
Cuadro 38 Análisis de varianza de los Intervalos de Tukey al 95% de las medias de selenio en líquido ruminal (parte 2)

Análisis de varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados de medias	F-Radio	P-valor
Entre grupos	0.152591	30	0.00508635	5.22	0.0000
Dentro de los grupos	0.0301898	31	0.000973863		
Total	0.18278	61			

9.9.-CONCENTRACIONES DE SELENIO EN SANGRE (PARTE II)

Las concentraciones de selenio en sangre fueron similares entre ambos grupos, sin diferencia significativa entre tratamientos.

Grafica 19 Intervalos de Tukey 95% confianza de medias de selenio en sangre (parte II)



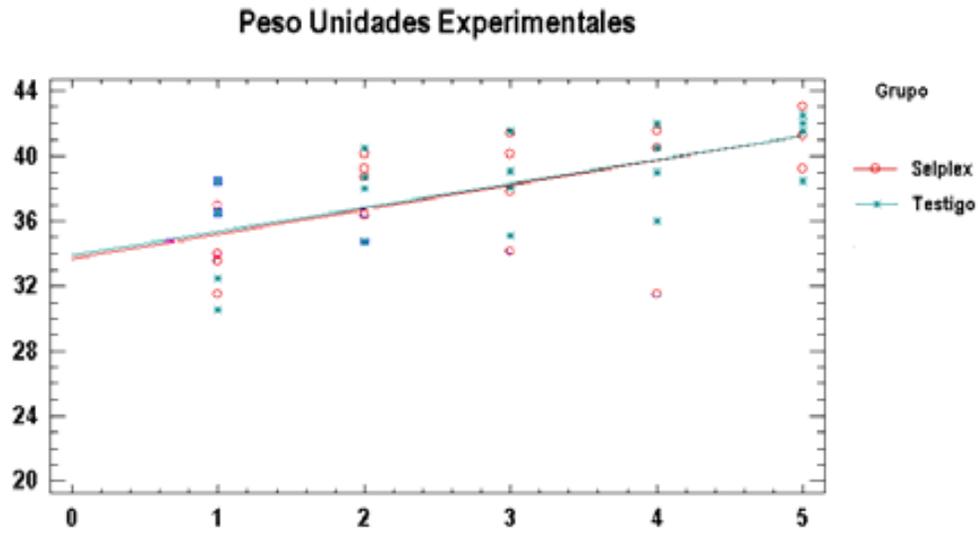
Cuadro 39 Análisis de varianza de los Intervalos de Tukey 95% confianza de medias de selenio en sangre (parte 2)

Análisis de varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados de medias	F- Radio	P- valor
Entre grupos	0.190867	40	0.00477168	7.44	0.0000
Dentro de los grupos	0.0788637	123	0.000641168		
Total	0.269731	163			

9.10.-PESOS (PARTE II)

La ganancia diaria de peso para los tratamientos placebo y selplex mostraron una curva ascendente, similar entre los dos grupos sin diferencia entre los tratamientos.

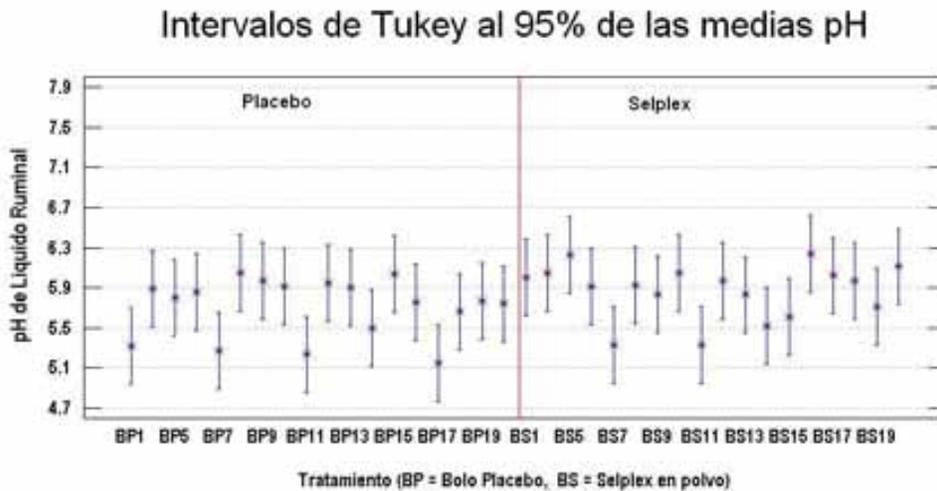
Grafica 20 Comportamiento de los pesos en el tiempo por tratamiento (parte II)



9.11.-RESULTADOS DE pH EN LÍQUIDO RUMINAL (PARTE II)

Los resultados de pH muestran que no mostraron diferencias entre los tratamientos para los valores de pH ruminal

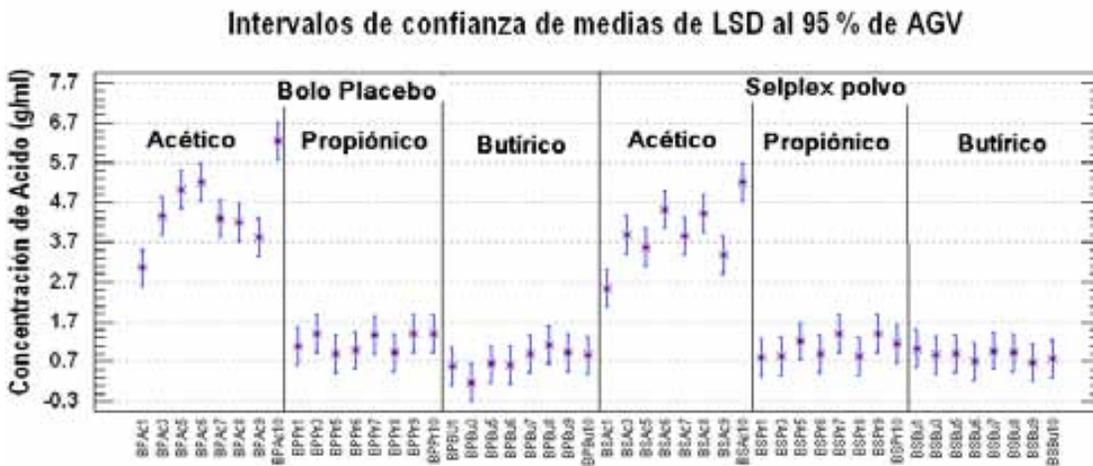
Grafica 21 Intervalos de tukey al 95 % de las medias pH (parte 2)



9.12.-CONCENTRACIONES DE ACIDO GRASOS VOLATILES (PARTE II)

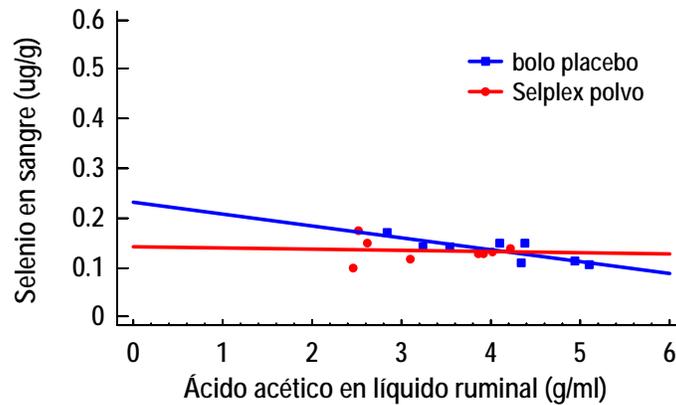
Los valores de Ácidos grasos volátiles para ambos tratamientos no mostraron diferencia estadísticamente significativa.

Grafica 22 Intervalos de confianza de medias de LSD al 95% de AGV (parte 2)



9.12.1.- CORRELACIONES ENTRE RESPUESTAS (PARTE II)

Grafica 23 Correlación de la Concentración de Se en sangre y Concentración de Acético en líquido ruminal por tratamiento (parte 2)

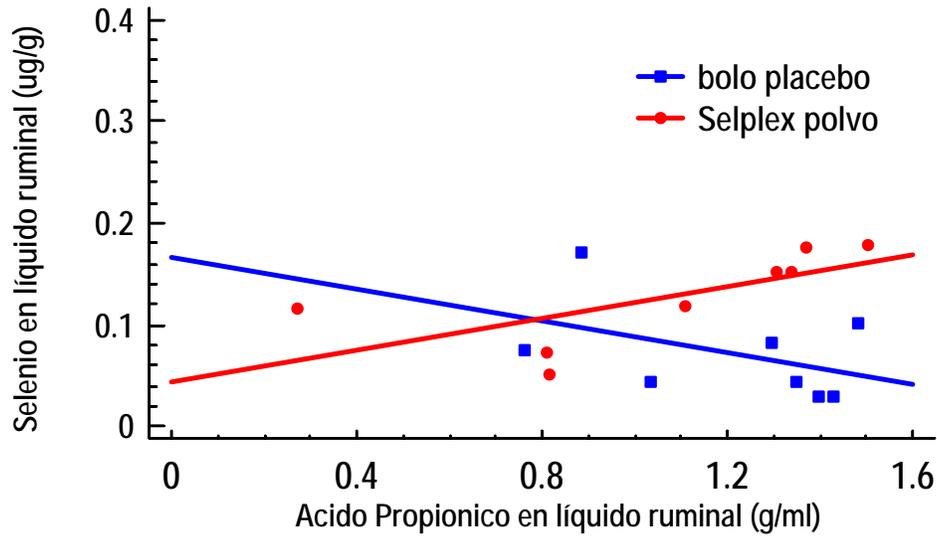


Cuadro 40 Valores de r cuadrada para la Correlación de la Concentración de Se en sangre y Concentración de Acético en liquido ruminal por tratamiento (parte 2)

TRATAMIENTO	% DE "R" CUADRADA
PLACEBO	62.79
SELPLEX	0.76

En la relación entre selenio en sangre y ácido acético existió una tendencia negativa importante, para el grupo placebo, sin observarse un efecto para el grupo selplex

Grafica 24 Correlación de la Concentración de Se en Líquido ruminal y Concentración de Acido Propionico en liquido ruminal por tratamiento (parte 2)

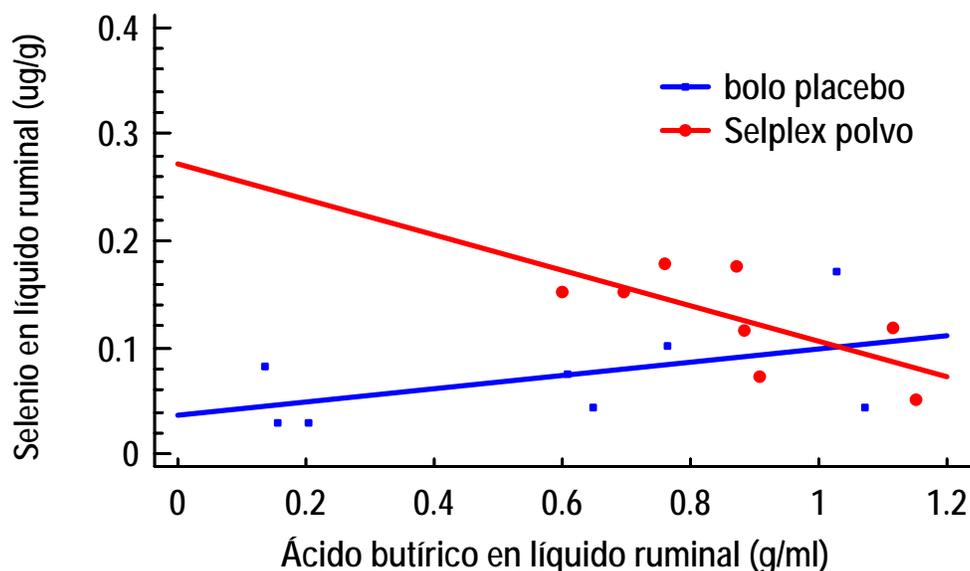


Cuadro 41 Valores de r cuadrada para la Correlación de la Concentración de Se en Líquido ruminal y Concentración de Acido Propionico en liquido ruminal por tratamiento (parte 2)

TRATAMIENTO	% DE "R" CUADRADA
PLACEBO	19.71
SELPLEX	46.10

La relación entre la concentración de selenio en líquido ruminal y la concentración de ácido propiónico es diferente entre tratamientos ya que existió una tendencia positiva para el grupo de selplex y una tendencia negativa para el grupo placebo.

Grafica 25 Correlación en la Concentración de Se en Líquido ruminal y Concentración de Acido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (parte 2)

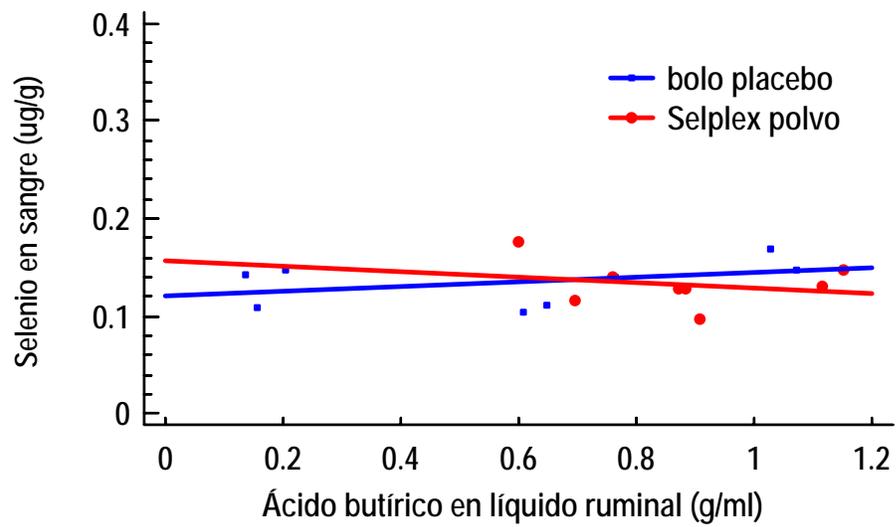


Cuadro 42 Valores de r cuadrada para la Correlación en la Concentración de Se en Líquido ruminal y Concentración de Acido Butírico en líquido ruminal por tratamiento (parte 2)

TRATAMIENTO	% DE "R" CUADRADA
PLACEBO	24.85
SELPLEX	46.79

En la relación de selenio en líquido ruminal y ácido butírico existió una tendencia negativa en el grupo de selplex y una tendencia positiva para el grupo placebo.

Grafica 26 Correlación en la Concentración de Se en sangre y Concentración de Acido Butírico en liquido ruminal por tratamiento



Cuadro 43 Valores de r cuadrada para la Correlación en la Concentración de Se en sangre y Concentración de Acido Butírico en liquido ruminal por tratamiento

TRATAMIENTO	% DE "R" CUADRADA
1	15.11
2	5.60

10.-DISCUSIÓN

Los resultados del trabajo fueron limitados por la condición de intoxicación que determinó en los animales la degradación apresurada de los bolos suspendidos en la red plástica. Los animales se deprimieron, bajaron el consumo de alimento y uno murió, fue necesario retirar los fragmentos restantes de los bolos y cambiar la dieta para agilizar la movilización del contenido ruminal con niveles tóxicos de Se, estos cambios afectaron seriamente tanto la medición de los niveles de selenio, como los posibles efectos en el consumo de alimento y la ganancia de peso de los animales experimentales afectados.

10.1.-LIBERACION DE SELENIO AL MEDIO RUMINAL POR LOS BOLOS DE CARRAGENINA (PARTE I)

La liberación de Selenio en el rumen por los bolos intra-ruminales está determinada por el tipo de aglomerante que se utilice (Judson 1988) y de ahí la gran variabilidad en la vida útil de los bolos utilizados por los diferentes autores. En este estudio al inicio del experimento la liberación de Se fue elevada, debido a la rápida desintegración del bolo, como consecuencia de la malla que se les puso para facilitar su extracción y examen a través de la fístula. De acuerdo a los estudios in-vitro, al suspender los bolos en la malla plástica, se evitó su funcionamiento normal, al impedir su caída normal al retículo y en consecuencia la bioadhesión, expansión, porosidad (Donald 1993) y la suficiente superficie de contacto, factores que afectaron la liberación del Se. Se deben además considerar los posibles efectos por el desgaste de los microorganismos, los cambios frecuentes de pH y temperatura, así como por la fricción provocada por el roce con las partículas del alimento contenidas dentro del rumen.

Al día 2 del experimento visto que todos los animales presentaron inhibición del consumo voluntario presumiblemente por la ocurrencia de selenosis se les retiró el bolo. Al sexto día del experimento se presentó la muerte de un animal, se determinó que su muerte, por la historia clínica y los resultados histopatológicos, fue consecuencia de selenosis.

Al retirar los bolos la cantidad de selenio liberada fue en decremento los días subsecuentes, sin embargo se observaron altibajos en la concentración, atribuibles a las partículas del bolo que quedaron en el rumen, que fueron liberando selenio en diferentes tiempos y a que el muestreo de líquido ruminal no fue homogéneo.

En el grupo de selenito de sodio se encontraron los máximos niveles de selenio en líquido ruminal, lo que se puede atribuir al tipo de sal, los selenitos son las más solubles (Hunter and Hudson 1981). Lo que concuerda con lo descrito por McDowell (1993), que menciona que el selenito de sodio es de mayor liberación que el selenato de bario, sin embargo al final del experimento se logró una mejor concentración de selenio con el uso del selenato de bario.

10.2.-CONCENTRACIONES DE SELENIO EN SANGRE (PARTE I)

Las concentraciones de selenio en sangre de los grupos selenito de sodio y selenato de bario no mostraron diferencias entre ellas, sin embargo se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los dos tratamientos de selenio inorgánico con respecto al testigo. Pese a la condición de intoxicación se pudo comprobar que la suplementación por medio de bolos de carragenina mejora las concentraciones de selenio en sangre sustancialmente, esto concuerda con lo descrito por Spross *et al* (2000) que encontraron que después de administrar bolos de Se con 4.6 y 1 % (selenito de sodio 46%) y 30% de Cu, elaborados con cemento dental a corderas, a partir de la primera semana el contenido de Selenio en sangre aumentó y se mantuvo durante 3 a 4 meses.

Las concentraciones de selenio en sangre se elevaron a partir del primer día de muestreo para los dos grupos de suplementación y se mantuvieron en la primera semana, observándose un decremento paulatino en la segunda semana de muestreo, sin embargo siempre fueron mayores que las concentraciones del grupo testigo aunque fue retirado el bolo al segundo día de muestreo.

Judson *et al* (1988) describen que el contenido sanguíneo de Selenio en los borregos, aumenta después de la primera semana de administrar comprimidos que contienen Selenio y Cu y siguieron aumentando hasta después de la cuarta

semana para permanecer elevados hasta por 32 semanas. En el presente estudio se liberó demasiado selenio al líquido ruminal, se provocó una mayor absorción y una elevada concentración de selenio en sangre en poco tiempo, reduciendo la vida útil del bolo.

En este trabajo se encontró en borregos en crecimiento, con bolos de selenito y selenato se obtuvieron mejores concentraciones sanguíneas, comparadas con el testigo y el grupo suplementado con seleno-levaduras. Lo que concuerda con lo descrito por Koenig et al, 1997 quienes encuentran una mejor absorción y retención para sales de selenio inorgánico, así también Alfaro et al, 1987, reportan que la absorción a partir de selenito fue mejor que con seleno-levaduras.

Langlands *et al.*, 1991 describen que los comprimidos fabricados con 15% de Se son efectivos para proporcionar los requerimientos hasta por 4 años y posiblemente por toda la vida productiva de los borregos. Los comprimidos con 10% de selenio solo fueron efectivos durante tres años, pero se consideraron mejores que los comerciales, que solo contenían 5%. También señalan que la administración de bolos con 20% de selenio no determinó diferencias en la concentración de selenio sanguíneo en comparación con bolos que tenían menor concentración. Observaron que al utilizar los bolos al 5% de Selenio y Fe, las cantidades de selenio sanguíneo en animales no tratados se mantuvieron de 15 a 45 ng/g y en los animales tratados variaron de 24 a 282 ng/g. Estos valores sanguíneos están por debajo de los encontrados en el presente estudio, posiblemente por las altas concentraciones determinadas por la liberación no controlada, que determinó niveles tóxicos.

Debido a la elevada liberación de selenio en el medio ruminal, las concentraciones promedio para el tratamiento de selenito de sodio fueron de 10.8 ppm y para selenato de bario 3.7 ppm. Estas dosis de selenio inorgánico concuerdan con las administradas por Kim y Mahan (2001), quienes a estas dosis encontraron signos de intoxicación, pérdidas de peso y baja en el consumo de materia seca en puercos, sin embargo, los valores encontrados por estos autores en sangre son superiores a los encontrados en el presente estudio. A su vez en un estudio realizado por Cristaldi et al (2005), donde probaron diferentes dosis de selenio, se

encontraron valores sanguíneos superiores a los del presente estudio sin reportar signos de intoxicación, ya que se encontró que animales con valores superiores a 0.3 ppm en sangre completa, presentaron una inhibición del consumo que fue el único signo de intoxicación detectado, lo que concuerda con lo descrito por Kim y Mahan (2001).

Los animales a los que se les administró bolos de selenio inorgánico que se desintegraron y que recuperaron el apetito al 100%, fueron animales con concentraciones sanguíneas de selenio que no sobrepasaron los 0.3 ppm.

Ningún animal, incluido el que murió sobrepasó las 0.5 ppm en sangre y aunque por los estudios histopatológicos se confirmó la selenosis, estos valores no concuerdan con los de Store y Herat, 1992, quienes mencionan valores de selenosis de 1340 a 3100 ng/ml.

Aunque las concentraciones sanguíneas del grupo testigo eran adecuadas, en los estudios de histopatología se encontraron lesiones sugerentes de distrofia muscular, indicativas de que los animales fueron en algún momento deficientes en selenio y los niveles sanguíneos de inicio no fueron indicadores adecuados.

10.3.-PESOS (PARTE I)

La ganancia diaria de peso para el tratamiento placebo mostró una curva ascendente, mientras que los tratamientos de selenito y selenato tuvieron un comportamiento descendente, atribuible a la situación de intoxicación, la caída del consumo y la sustitución de la dieta por forraje. Esto concuerda con lo reportado por Kim y Mahan (2001) que con 5 ppm administradas diariamente en el alimento encontraron signos de selenosis, baja conversión alimenticia, baja ganancia de peso y una diferencia significativa en el peso final. En este trabajo, se presentó intoxicación a 3.7 ppm y 10.8 ppm, en contraste Cristaldi *et al* (2004) utilizando corderos probaron diferentes dosis de selenio en la dieta 0.2, 2, 4, 6, 8 y 10 ppm y no encontraron signos de selenosis con dosis iguales o menores a 10 ppm.

Kuchel y Buckley (1969) al utilizar varias combinaciones de comprimidos que contenían Se y Fe, observaron que no existían diferencias estadísticas en la ganancia de peso en borregos. Esto concuerda con lo descrito por Ellis *et al* (1987), al usar bolos que contenían Co, Se y Cu, no encontraron diferencias

significativas en los pesos. Sin embargo, Millar y Meads (1988) encontraron diferencias significativas en el peso alcanzado en borregos, después de 8 meses. Spross et al (2000) encontraron diferencias estadísticas en el peso con respecto al testigo con un bolo que contenía 4.6% de selenio.

10.4.-ANALISIS DE SELENOSIS

El animal que murió en el transcurso del experimento, del grupo de selenito de sodio, presentó valores promedios de concentración de selenio en sangre de 0.471 ppm, inferiores a los reportados por Cristaldi et al (2004) quienes no reportan signos de selenosis con un rango de 0.1-0.87 ppm.

Los animales tratados con los bolos de selenio inorgánico que se desintegraron, dejaron de comer cuando los valores de selenio sanguíneos fueron de 0.414 ppm lo que sucedió en los primeros 5 días del estudio, en los 5 días posteriores, el consumo empezó a mejorar y los valores promedio descendieron a 0.375 ppm.

Los animales recuperaron el consumo de la dieta integral al 100%, cuando los valores sanguíneos de selenio cayeron por debajo de los 0.300 ppm, con lo que se puede concluir, que bajo las condiciones de este estudio se presentó la baja en el consumo de alimento como signo de intoxicación con valores sanguíneos \geq a 0.300 ppm. Lo cual concuerda con lo reportado por Smith y Roe, 1999. sin embargo para otros autores como Kim y Mahan (2001) y Cristaldi et al (2004) estas concentraciones sanguíneas, están por debajo de aquellas en que ellos encontraron signos de intoxicación, sin embargo la presentación de toxicidad por selenio es multifactorial y de ello dependen las concentraciones mínimas tolerables.

10.5-pH RUMINAL (PARTE I)

En cuanto a los valores de pH Kim (1996) encontró similitud para los valores de pH usando selenito y selenometionina, concluyó que el selenio no afecta el pH del medio ruminal. Esto concuerda con lo encontrado en el presente trabajo en el cual no se encontraron diferencias estadísticas significativas, pese a los niveles tóxicos observados. Las diferencias numéricas que se observan contra el tratamiento

testigo y los grupos de selenio inorgánico, son explicables por la baja del consumo de concentrados y el solo comer forrajes.

10.6.-CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES (PARTE I)

Las diferencias encontradas en la producción de AGVs entre los animales tratados con sales de selenio inorgánicas y el testigo son atribuibles más a la alimentación y el problema de intoxicación que se presentó en el estudio, ya que los animales tratados con selenito de sodio y selenato de bario recibieron una dieta 100% de forrajes, mientras que los animales testigos consumieron una dieta con 65 % de granos.

Los resultados encontrados para selenito concuerda con lo encontrado por Kim, 1997, quien evaluó el efecto en la fermentación ruminal en presencia del selenio, usando una dieta con selenito de sodio 2 ppm. El selenito de sodio no afectó la concentración total de ácidos grasos, sin embargo incrementó en forma relativa la proporción de butirato (57 A:18 P:12 B) en comparación con el testigo (57A:18P:11B). Esto concuerda con lo descrito por Hidiroglou (1976), que en presencia de selenito de sodio encontró un aumento de ácido acético, butírico y valérico.

Estos resultados muestran que el adicionar selenio en la flora ruminal podría tener un efecto sobre la producción de ácidos grasos volátiles.

10.7.-CONCENTRACIÓN DE SELENIO EN LÍQUIDO RUMINAL (PARTE II)

Las concentraciones de selenio encontradas en el presente estudio muestran que no existen diferencias en cuanto a concentración de selenio en líquido ruminal para el grupo de selenio a partir de levadura comparado contra el grupo testigo.

Se sabe que las sales de selenio más solubles son los selenitos, y que la selenometionina tiene una mejor absorción pero en corto plazo. (Hunter y Hudson, 1981).

10.8.-CONCENTRACIONES DE SELENIO EN SANGRE (PARTE II)

Las concentraciones de selenio en sangre de los grupos testigo y selenio orgánico no mostraron diferencias entre ellos, el administrar “*Selplex*” a borregos en

crecimiento no mejoró las concentraciones de selenio en sangre, lo cual no concuerda con lo descrito por McDowell, 1997, al comparar tres formas diferentes de suplementación: selenito de sodio MUSE, selenato de bario (Deposel) y selenio orgánico en mezcla mineral, encontró una gran diferencia entre tratamientos, con una mayor concentración de selenio en fluidos y órganos para la mezcla de Se orgánico comparado contra los suplementos inorgánicos. Sin embargo, las concentraciones de Selenio en fluidos y tejidos dentro del primer año, al comparar selenito de sodio contra selenato de bario, no demostraron diferencias. Al final del estudio, se encontraron altas concentraciones de Selenio para el grupo con selenato de bario y selenio orgánico, comparados con el control y el selenito de sodio, concluyendo que selenato de bario mantiene por más tiempo las concentraciones de Selenio que el selenito de sodio, y según este autor, el selenio orgánico logra mejores concentraciones de selenio que el control y el selenio inorgánico (McDowell et al 1997).

10.9.-PESOS (PARTE II)

Los pesos obtenidos en este estudio no tuvieron diferencias entre los tratamientos placebo-selplex lo que indica que no hay realmente un efecto en cuanto a ganancias de peso con la adición en la dieta de selenio orgánico como suplemento.

10.10.-pH RUMINAL (PARTE II)

En cuanto a los valores de pH Kim, 1996, encontró similitud para los valores de pH usando selenito y selenometionina concluyó que el uso de selenio no afectó el pH del medio ruminal, tal como se observó también en este trabajo.

10.11.-CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES (PARTE II)

Los resultados encontrados para *Selplex* no concuerdan con los encontrados por Kim, 1997, quien evaluó el efecto de fermentación de la microflora ruminal en presencia de selenio, usando Se y L- selenometionina a 2 ppm encontrando un aumento en la producción de acetato con disminución de butirato en presencia de selenometionina adicionada con salvado de trigo A:P:B (59:17:10),

Estos resultados muestran que el adicionar selenio en la flora ruminal tiene un efecto sobre la producción de ácidos grasos volátiles, lo cual no se observó en el presente estudio.

11.-CONCLUSIONES

- 1.- La malla plástica que se aplicó a los bolos de liberación lenta cambió los patrones de comportamiento de liberación, y una liberación no controlada del selenio que provocó una intoxicación (selenosis)
- 2.- La suplementación de selenio por medio de bolos de liberación lenta de carragenina elaborados con selenio inorgánico administrados intra-ruminalmente mejoró las concentraciones de selenio en sangre sustancialmente.
- 3.- A concentraciones de selenio de 0.414 ppm la sintología de selenosis se caracterizó por la caída de consumo y las ganancias diarias de peso.
- 4- Los valores de pH no fueron influidos por las diferentes sales de selenio en el medio ruminal
- 5.- El uso de sales de selenio orgánico de levaduras no demostró efectos sobre la concentración de selenio en líquido ruminal, sangre, ganancias de peso o cambios de pH en rumen.

12.- BIBLIOGRAFIA

1. Alfaro, EMW. Neathery, WJ, miller Rp., Gentry CT., Crowe AS., Fielding RE., Etheridge DG., and Blackmon DM. 1987 effects of varying the amounts of dietary calcium on selenium metabolism in dairy calves. J. dairy Sci. 70:831.
2. Ammerman CB, Millar SM. Selenilenium in ruminant nutrition: a review. J Dairy Sci 1975;58: 1561-1577) y Shamberger RJ. Biochemistry of selenium. New Cork: Plenum Press,1983
3. Anderson PH, Berret S, Patterson DSP. Glutathione preoxidase activity in erythrocytes and muscle of cattle and sheep and its relationship to selenium. J Comp Path 1978;88:181-188.
4. Arthur D. Selenium content of some feed ingredients available in Canada. Can J Anim Sci 1971;51:71-74.
5. Arthur J.R., Nicol F., Beckett G.J. 1990. Hepatic iodothyronine 5'-deiodinaseleni. The role of selenilenium. Biochem. J. 272: 537-40
6. Arthur JR, Beckett GJ. Symposium 2 Newer aspects of micronutrients in at risk groups. New metabolic roles for selenium. Proc Nutr Soc 1994;53:615-624.
7. ALLTECH 2003 Selenium nutrition of dairy cows: comparing responses to organic and inorganic selenium forms. http://www.engormix.com/selenium_nutrition_of_dairy_e_articles_128_GDL.htm
8. Bañuelos, G.S. y Mayland, H.F.1999. Absorption and Distribution of selenium in animals consuming canola grown for selenium phytoremediation. Ecotoxicology and Enviromental Safety. 46: 322-328
9. Barradas, L.H.V. y Cook, R.M. 1981. Contenido mineral de suelos, pastos y ganado de ranchos de las regiones central y norte del estado de Veracruz. Mem. XV Reunión anual del INIP. P 167-170.

10. Behne D., Kyriakopoulos A., Meinhold H., Koherle J. 1990. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 1143-49
11. Behne Dietrich y Kyriakopoulos Antonios. 2001. Mammalian Selenium-Containing Proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21:453-73.
12. Bjornstedt M, Kumar S, Bjorkhem L, Spyrou G, Holmgren A. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed Environ Sci* 199;Sept;10(2-3):271-279.
13. Borglund , Mand Akesson, B. 1988. Effect of selenium supplement on the distribution of selenium in plasma proteins of health subjects. *Int J. Vit, Nutr, Res*; 58, 97—102.
14. Brannon L. Peppas. *Polymers in Controlled Drug Delivery. Magazine.* 1997. Medical device link. MPB. Nov 1997, p. 34. <http://www.device-link.com/mpb/index.html>
15. Butler, GW, Peterson PJ, 1961. Aspects of the fecal excretion of selenium by sheep. *NZ J Agric. Res.* 4, 484-491. (Hidiroglou MD, Heanley P, Jenkis KJ, 1968. Metabolism of inorganic selenium in rumen bacteria. *Can J. Physiol. Pharm.* 46, 229-232.).
16. Cabrera, R., Lopez, A., Morales, S. et al. Fistulación y canulación permanente del compartimento 1 (Rumen) en Llamas (*Lama glama*). *Arch. med. vet.* [online]. 2000, vol.32, no.1 [citado 18 Junio 2007], p.131-138. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2000000100017&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0301-732X.)
17. Chu F.F., Esworthy R.S., Doroshov J.H. 1993. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.* 268:2571-76
18. Combs GF, Jr And Gray WP. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 179-92.

19. Contreras Jácome; Juárez Lagunas; Montero Lagunas. Determinación de la tasa de digestión en forrajes. Manual de laboratorio 2000.
20. Coppes Zulema. Selenio en la Nutrición y el Cáncer . AQFU: Revista No.24 (Agosto 1999)
21. Cristaldi LA, mc Dowell LR, Buergelt CD, Davis PA, Wilkinon NS, Martin FG. Tolerance of inorganic selenium in wether sheep. Small Rum 2005. 56; 205-213.
22. Croteau W., Whittemore S.L., Scheineider M.J., St. Germain D.L. 1995. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinaseleni. J. Biol. Chem. 270:16569-75
23. Diplock A. T, B. Contempore, J. Dumont, N. Bebe and J. Vanderpas. 1997. Interaction of Selenium and Iodine Deficiency in the Development of Human Iodine Deficiency Diseleniaselenis. In: P.W.Fischer, M.R.L´Abbé, K.A. Cockell and R.S. Gibson (Eds.). pp 63-68. 1997. Trace Elements in Man and Animals-9. NRC Reseleniarch Press. Ottawa, Canadá.
24. Donald GE, Langlands JP, Bowles JE, Smith AJ, Burke GL. Selenium supplements for grazing sheep.3. Development o fan intra-ruminal pellet with an extended life. Anim Feed Sci Technol 1993; 40: 295-308.
25. Doménech. Martínez. Tecnología Farmacéutica. Biofarmacia y Farmacocinética. Vol 11. Síntesis. España. 2001. Pp: 319-333.
26. Ellis NJS, Shallow WM, Judson GJ. Weight gains of lambs treated with soluble glass bullet containing cobalt, selenium and copper. Austr Vet J 1987;64:93-94.)
27. Erskine RJ, Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Scholz RW., Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with haigh and low somatic cell counts. J Am Vet Med Ass 1987;190: 1417-1421.
28. Fish R. E. And E.W. Swanson. 1982. Effects of Excessive Intakes of Iodine Upon Growth and Thyroid Function of Growing Holstein Heifers. J. Dairy Sci. 65:605-610.

29. Galyen M. L., L.J. Perino and G.C. Duff. 1999. Interaction of Cattle Health/Immunity and Nutrition. *J. Anim. Sci.* 77:1120-1134
30. Gerloff, 1992). Gerloff, B. J. 1992. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 70:3934.
31. Gill, W. W. y H. B. Rice. 1985. Factors affecting selenium status of forages. *Animal Nutrition and Health.* May, 1985:26.
32. Goehring TB, Palmer IS, Olson OE, Libal GW, Wahlstrom RC, 1984, Effect of seferous grains and inorganic Se on tissue and blood composition and gowth performance of rats and swine. *J Anim. Sci.* 59, 725-732.
33. Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs Toxicity. *Regulatory, Toxicology and Pharmacology* 2003; 38:232-42.
34. Grace, N. D., M. J. Ulyatt, y J. C. MacRae. 1974. *J. Agric. Sci*, 82:321-330.
35. Guerrero BLL. Interrelacion del contenido de selenio y cobre en lana de ovino y suelo de Cuajomulco y tres marias (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.)
36. Gunther WH, Salzman MN. Methods in selenium chemistry. IV. Synthetic approaches to polydiselenides. *Ann N Y acad Sci.* 1972; 192:25-43.
37. Gurvan Michel, William Helbert, Richard Kahn, Otto Dideberg and Bernard Kloareg The Structural Bases of the Processive Degradation of ι-Carrageenan, a Main Cell Wall Polysaccharide of Red Algae_ *Journal of Molecular Biology*, Volume 334, Issue 3, 28 November 2003, Pages 421-433.
38. Gutierrez OC, Rosiles MR, Ducoing WA. Liberación de selenilenio en soluciones amortiguadoras a partir de comprimidos elaborado con diferentes tipos de aglomerantes. *Vet Mex*; 2006, 37 (3) 291-301.
39. Harrison JH, Hancock DD and Conrad HR. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J Dairy Sci* 1984; 67: 123-132.
40. Hidiroglou M., lessard JR. The effect of selenium or vitamin E supplementation on valatile fatty acid content of rumen liquor in shepp fed a purified diet, *int. J.Vit. Nutr. Res.* 46: 458-463 (1976)

41. Howell J McC, JM gawthorne, CL White, editors. Trace element metabolism in man and animals. Canberra: Aust Acad Sci, 1981.
42. Huerta M. 2006. Apuntes de la cátedra de Metabolismo de Minerales. Texcoco Edo de Mex 2006 Universidad Autónoma Chapingo. .
43. Hudson DR, Hunter RA, Peter DW. Studies with the intra-ruminal selenium pellet. II. The effect of grain size of selenium on the functional life of pellets in sheep. Aust J Agric Res 1981; 32: 935-945.
44. Hunter RA, Peter DW, Hudson DR, Chandler BS. Studies with the intra-ruminal pellet. some factors influencing the effectiveness of the pellet for selenium supplementation of sheep. Aust J Agric Res 1981; 32: 927-933.
45. Judson GJ, Brown TH, Kemper BR, Turnbull RK. Trace element and vitamin B12 status of sheep given an oral dose of one, two or four soluble glass pellets containing copper, selenium and cobalt. Aust J Exp Agric 1988; 28: 299-305.
46. Julien WE, Conrad HR, Moxon AL. Selenium and vitamin E and incidence of retained placenta in parturient dairy cows. 2. Prevention in commercial herds with pre-partum treatment. J Dairy Sci 1976, 59: 1960-1962.
47. Kim J., Peter J., Van soest., Gerald F., 1997. studies on the effects of selenium on rumen microbial fermentation in vitro. Biol Trace Element Res. 56:203-213.
48. Kim YY, Mahan DC. 2001. Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic Se on selenium toxicity of growing finishing pigs J. Anim. Sci. 79, 942-948.
49. Koenig, K.M., Rode, L.M., Cohen, R.D.H., and Buckley, W.T. (1997). Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. Can. J. Anim. Sci 75, 817-827.
50. Kryukov G.V. Kryukov V.M., Gladyshev V.N. 1999. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. J. Biol. Chem. 274:33888-97.

51. Kuchel RE, Buckley RA. The provision of selenium to sheep by means of heavy pellets. *Austr J Agric Res* 1969; 20: 1099-1107.)
52. Kyriakopoulos A., Hammel C., Gessner H., Behne D. 1996. Characterization of an 18 kDa-selenium-containing protein in several tissues of the rat. *Am. Biotech. Lab.* 14:22
53. Kryukov G.V. Kryukov V.M., Gladyshev V.N. 1999. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J. Biol. Chem.* 274:33888-97.
54. Lamand M. Dystrophies musculaires des jeunes ruminants. *Ann Nutr Alim* 1966;20:13-39.
55. Langlands JP, Donald GE, Bowles JE, Smith AJ. Subclinical selenium insufficiency. 1. selenium status and the response in liveweight and wool production of grazing ewes supplemented with selenium. *Austr J Agric Res* 1991; 31:25-31.)
56. Langlands JP, Donald GE, Bowles JE, Smith AJ. Se um supplements for grazing sheep.4. The use of intra-ruminal pellets containing elevated quantities of selenium. *Anim Feed Sci Technol* 1994; 46: 109-118. y
57. Langlands J. P., J. E. Bowles, G. E. Donald and A. J. Smith CSIRO Effectiveness of intra-ruminal pellets Division of Animal Production, Pastoral Reseleniarch Laboratory, Private Bag P.O., Armidale, N.S.W. 2350, Australia October 2003.
58. Leván, D. Pesutic, G. Schurig, F. Wittwer, P. A. Contreras, J. Kruze (archmv[arroba]uach.cl) Suplementación con selenio en vaquillas: Efecto sobre la respuesta inmune a las vacunas *Brucella abortus* cepa RB51 y toxoide tetánico. Publicación original: *Arch. med. vet.*, 2005, vol.37, no.2, p.105-110. ISSN 0301-732X. [archmv\[arroba\]uach.cl](mailto:archmv@uach.cl)
59. Maas J, Galey D, Peuroi JR, Case JT, Littlefield ES, Gay CC, Koller LD, Crisman RO, Weber DW, Warner DW, Tracy ML, 1992. The correlation between serum Se and blood Se in cattle. *J Vet. Diagn. Invest.* 4, 48-52.

60. Mahan, DCTR. Cline, and B. Richert. 1999. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics and loin quality. *J. Anim. Sci.* 77:2172-2179.
61. Mangione, M. R. Giacomazza, D. Bulone, D. Martorana V. and San Biagio P. L. Thermoreversible gelation of κ -Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation *Biophysical Chemistry*, Volume 104, Issue 1, 1 May 2003, Pages 95-105
62. McDowell LR, Valle G, L Cristaldi, Davis O, Roselenindo, and Wilkinson. Selenium Availability and Methods of selenium supplementation for grazing ruminants. *Proceedings 13th Annual Florida Nutrition Symposium*, pp 86-10
63. McDowell, L.R. Conrad, G.L. Ellis, and R.M. Mason, Jr. 1985. Cooper, selenium and zinc supplementation for grazing cattle. *Florida Nutrition Conference*. Daytona Beach, Florida. Pp. 79-96.
64. McDowell, L.R. 1997. Trace element supplementation in latin America and potential for organic selenium. *Proc. Alltech 13th Annual Biotechnology in the Feed Industry*. P45 (Abstract)
65. McKenzie RC, Rafferty TS, Beckett GJ. Selenium: an essential element por inmue function. *Immunol Today* 1998;19:342-5.
66. Millar KR, Meads WJ. Selenium levels in the blood, liver, kidney and muscle of sheep after the administration of iron/selenium pellets or soluble glass boluses. *NZ Vet J* 1988;36:8-10.
67. Naziroglu M., aksakal M, cay M., Celik S. 1997. Effects of vitamin E and selenium on some rumen parameters in lambs. *Acta. Vet. Hung.* 45(4):447-456.
68. Norton OA, McCarthy FD. Use of injectable vitamin E and selenium-vitamin E emulson in ewes and suckling lambs to prevent nutritional muscular dystrophy. *Anim Sci* 1986;52:497-508.)
69. NRC, 1980 Mineral Tolerance of Domestic Animals, National Academy of Sciences-National Reseleniarch Council, Washington, DC.),

70. NRC. 1983. Selenium in Nutrition. (Revised Ed.). National Academy Press, Washington, DC.
71. NRC. 1996. Nutrient Requirements of beef Cattle. 7th revised edition. National Academy press. Washington, D.C.
72. Ortman, K. and B Pehrson. 1999. effect of selenate as feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. J.Anim.Sci. 77:3365-3370.
73. Peter DW, Hunter RA, Hudson DR. Optimum Seleni grain size for selenium pellets.
74. Ramírez B. J. E. 1995. La Carencia de Selenio, su Diagnóstico y Suplementación en un Sistema de Producción Caprina del Sureste del Estado de Tlaxcala. Tesis de Maestría. Facultad de estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México, D.F. 125 pp.
75. Ramírez BJE, Tortora JL, Huerta M, Aguirre A, Hernandez LM. 2001. Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau Small Ruminant Res. 41 (2001) 81-85)
76. Ramírez Altamirano Virgen Divina. Estudio de factibilidad de uso de carrageninas en la fabricación de bolos intrarruminales de selenato de bario y comparación de los perfiles de concentración en sangre y líquido ruminal. Tesis fes cuautitlan 2006
77. Robinson MF, Campbell DR, Steward RD, et al. Effect of daily supplements of selenium on patients with muscular complaints in Otago and Canterbury. NZ Med J 1981.
78. Roman. Fernando. Innovación y Desarrollo Farmacéutico. Asociación Farmacéutica Mexicana. México. 1990. Pp. 121 -133.
79. Rosiles M., R., V.M. González R., R. López L. Y J. Peña P. 1993. Niveles comparativos de selenio en pelo de bovinos sanos a nivel del mar, con los de insuficiencia cardiaca en el valle de México. Vet. Mex. 24(2): 135-137
80. Ruth OH. Selenium responsive disease of sheep. J. Am Vet Med Assoc 1970; 157:1507-1511.

81. Rotruck JK, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Sci* 1973; 179: 588-590.
82. Skoug J.W., Halstead G.W., Theis D.L., Freeman J.E., Fagan D.T., Rohrs B.R., *Pharmaceutical Technology en español*, diciembre (1996)
83. Smith, G.A.D. and Rae D.O., Selenium toxicosis in a flock of Katahdin hair sheep. *Can Vet J.* 1999 March; 40(3): 192–194.
84. Smith KL, Harrison JH, Hancock DD, Todhunter DA, Conrad HR. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J Dairy Sci* 1984, 67: 1293-1300.
85. Smith KL, Hogan JS, Conrad HR. selenium in dairy cattle: its role in disease resistance. *Vet Med* 1988; jan. 72-78.
86. Spears WJ. Harvey RW, Sergeron EC. Effects of marginal selenium deficiency and winter protein supplementation on growth, reproduction and selenium status of beef cattle. *Anim Sci* 1986;63;586-593)
87. Spross, S.A.K. 1982. Evaluación del contenido mineral en suelo, planta y animal de cinco ranchos del estado de México y estado de Hidalgo. Tesis de maestría, FESC, UNAM.
88. Spross S A, Blanco OMA, Rosiles MR. Evaluación de comprimidos intraruminales de selenio por concentración sanguínea y lanar de corderas semiestabuladas. *Vet Mex* 2000; 31(2) 121-127.)
89. Srinivas Janaswamy and Rengaswami Chandrasekaran Cation-induced polymorphism in iota-carrageenan Cation-induced polymorphism in iota-carrageenan.
90. Stowe, H. D. y T. H. Herdt. 1992. Clinical assessment of selenium status of livestock. *J. Anim. Sci.* 70:3928.
91. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:391-402.
92. Ursini F, Maiorino M, Roveri A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: more than an antioxidant enzyme? *Biomed Environ Sci* 1997;sep10:327-332.

93. Van Ryssen, J.B.J., J.T. Deagen, M.A. Beilstein, and P.D. Whanger. 1989. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. *J. Agric. Food Chem.* 37:1358-1363.
94. Vila J. J. 2001. *Tecnología Farmacéutica. Volumen II. Formas Farmacéuticas.* Editorial Síntesis, S.A. España. Págs: 379 - 383, 422 - 434.
95. Whanger PD, Weswing Ph, Oldfield JE. selenium, sulfur and nitrogen levels in ovine rumen microorganisms. *J Anim Sci* 1978, 46: 515-519.
96. Wheatley LE, Beck NFG. The influence of season and husbandry on the selenium status of sheep in a deficient area. *Br Vet J* 1988; 144:246-251.)
97. White, C. L. y M. Somers. 1977. Sulphur-selenium studies in sheep. I. The effects of varying dietary sulphate and selenomethionine on sulphur, nitrogen, and selenium metabolism in sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 30:47.
98. Wilkins JF, Hamilton BA, Low release of selenium from recovered ruminal pellets. *Aust Vet J* 1980; 56: 87-89.
99. Weiss WP, Hogan JS, Smith KL. Relationship among selenium, vitamin E, and mammary health in commercial dairy herds. *J Dairy Sci* 1990; 73:381-388.
100. Witchel, J. J., N. D. Grace, E. C. Firth. 1998. The effect of injectable barium selenate on the selenium status of horses on pasture. *N. Zealand Vet. J.* 46: 186-190.
101. Wittwer F, O Araya, P. Contreras. 2002. Strategic procedure for important herd problems of heifers. In: *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine.* Edited by: Kaske M., Scholz, H., Höltershinken. Keynote Lectures, XXII World Buiatric Congress. Hannover, Germany.
102. Wright, P.L., Bell, M.C., 1966. Comparative metabolism of Se and tellurium in sheep and swine. *Am. J. Physiol.* 221,6-10.
103. Yoshiaki Yuguchi, Thanh Thi Thu Thuy, Hiroshi Urakawa and Kanji Kajiwara Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and

concentration dependence Food Hydrocolloids, Volume 16, Issue 6, November 2002, Pages 515-522

104. Zacharaa B. A., U. Trafikowskaa, H. Lejmanb, C. Kimberc and M. Kapturc Selenium and glutathione peroxidase in blood of lambs born to ewes injected with barium selenate a Department of Biochemistry, Medical School, Bydgoszcz, Poland b Diagnostic Laboratory, Medical School, Bydgoszcz, Poland c Stock-farm, Samokleski, Bydgoszcz, Small Ruminant. Volume 11, Issue 2, July 1993, Pages 135-141 Poland.
105. http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/lecciones/cap03/cap03_09.html consultada el 14 de Agosto del 2006.
106. <http://www.fmcbiopolymer.com/PopularProducts/FMCCarrageenan/DispersionandSolubilize/tabid/821/Default.aspx>