



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE BOLOS DE SELENIO Y
SU EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

VÍCTOR MANUEL DÍAZ SÁNCHEZ

TUTOR

DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
UNAM-FESC

COMITÉ TUTOR

DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES
UNAM-FESC
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
UNAM-BIOMEDICAS

CUAUTITLÁN IZCALLI EDO. DE MÉXICO 2017



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.

Agradecimientos:

Estoy profundamente agradecido con todas y cada una de las personas que estuvieron involucradas de forma directa e indirecta para la realización de este proyecto que termina parcialmente el día hoy. Hay una larga lista de personas a las cuales agradecer, algunas me acompañaron hasta este momento y otras fueron compañeras y compañeros de una parte de este trayecto. Nombrarlas podría generar una lista tal vez tan larga como la misma tesis y podría olvidar a muchos que no son menos importantes, así que si estás leyendo esto te agradezco por acompañarme por ayudarme y por tu apoyo. Las palabras no bastan, porque hiciste que el camino fuera más ligero y más alegre. GRACIAS.

Gracias por acompañarme y apoyarme y darme palabras de aliento y tu amor. Gracias Fernanda por estar aquí y poder compartir esto contigo. Te amo.

Le agradezco profundamente a mi familia, sin la cual yo no estaría aquí en este momento el día de hoy, gracias mamá, gracias papá y gracias Carlos. Me han aguantado en mis mejores y malos ratos y han hecho que todo esto sea posible apoyándome de maneras inimaginables. Los amo.

Todavía no soy ni la mitad de la persona que deseo ser. Aún tengo que trabajar mucho en mí. Soy mi proyecto más importante (Anónimo).

Es importante ser inteligente, tener talento, títulos y ser buen líder, pero más importante es ser buena persona...

I. Contenido temático

Agradecimientos	I
II. Índice de Figuras	V
III. Índice de tablas	VII
IV. Abreviaturas	IX
V. Resumen	X
1. Introducción	1
1.2 Minerales	1
1.3 Selenio	1
1.3.1 Absorción y metabolismo del selenio	2
1.3.2 Distribución	4
1.3.3. Excreción del selenio	5
1.4. Funciones del selenio	5
1.5. Deficiencia de selenio	6
1.5.1. Enfermedades relacionadas a la deficiencia de selenio en rumiantes	8
1.5.1.1 Distrofia muscular nutricional	8
1.5.1.2 Anemia	9
1.5.1.3. Mastitis	9
1.5.1.4. Retención placentaria	9
1.5.1.5. Respuesta inmune comprometida	9
1.6. Suplementación de selenio	10
1.7. Tratamiento y prevención de la deficiencia de selenio en pequeños rumiantes	11
1.8. Toxicidad del selenio en pequeños rumiantes	12
1.8.1. Signos de toxicidad por selenio ingerido	12
1.9. Métodos de suplementación y administración de fármacos y minerales	12
1.9.1. Bolos intrarruminales	13
1.10. Selenio y balance oxidativo	14
2. Justificación	20

3. Objetivos	21
3.1. Objetivo general	21
3.2. Objetivos particulares	21
4. Hipótesis	21
5. Materiales y métodos	22
5.1. Norma de ética y bienestar experimental	22
5.2. Localización	22
5.3. Animales	22
5.4. Alimentación	24
5.5. Peso y ganancia de peso de los animales de estudio	24
5.6. Consumo de alimento	25
5.7. Bolos intrarruminales	25
5.7.1. Evaluación de los bolos fabricados, vía granulación por fusión	26
5.7.2. Administración de bolos a los animales	26
5.8. Selenio parenteral	27
5.9. Estimulación de la respuesta inmunitaria de los animales de estudio	28
5.10. Muestras de sangre	29
5.11. Estimación de las concentraciones de selenio en eritrocitos	28
5.12. Estimación de GSH	30
5.13. Estimación de MDA	30
5.14. Estimación de la actividad de Catalasa	31
5.15. Estimación de la concentración inmunoglobulina G en los grupos de estudio a través de la prueba de ELISA	32
5.16. Hemaglutinación indirecta para la determinación de anticuerpos contra antígenos capsulares de <i>Manhemia haemolytica</i>	33
5.17. Diseño experimental	34
6. Resultados	35
6.1. Evaluación de las características físicas de los bolos intrarruminales de selenio	35

6.2. Evaluación del peso en los animales de estudio	36
6.3. Ganancia de peso en los grupos de estudio	39
6.4. Consumo de alimento	43
6.5. Evaluación de la concentración de selenio en eritrocitos en los animales de los grupos de estudio	47
6.6. Evaluación de las Unidades de Catalasa en eritrocitos de los animales en los grupos de estudio	52
6.7. Evaluación de la concentración de MDA en plasma de los animales en los grupos de estudio	56
6.8. Evaluación de la concentración de GSH en plasma de los animales en los grupos de estudio	61
6.9. Evaluación de la concentración de GSH en eritrocitos de los animales en los grupos de estudio	67
6.10. Evaluación de las absorbancias para IgG en suero de los animales en los grupos de estudio	72
6.11. Evaluación de la hemoaglutinación indirecta para <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A1 y A2 en suero de los animales en los grupos de estudio a través del título de anticuerpos	76
7. Discusión	86
8. Conclusión	96
10. Bibliografía	97

III. Índice de figuras

1. Metabolismo de las diferentes formas de suplementación de selenio	4
2. Medias de peso por grupo de estudio dentro del experimento	37
3. Peso promedio por día de los animales por grupo de estudio	38
4. Peso de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	39
5. Medias sobre la ganancia de peso por grupo de estudio dentro del experimento	41
6. Ganancia de peso promedio por día de los animales por grupo de estudio	42
7. Ganancia de peso de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	43
8. Medias sobre consumo de alimento por grupo de estudio dentro del experimento	45
9. Consumo de alimento promedio por día de los animales por grupo de estudio	46
10. Consumo de alimento de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	47
11. Medias de concentración de Se por grupo de estudio dentro del experimento	49
12. Concentración de selenio en eritrocitos en los grupos de estudio	50
13. Concentración eritrocitaria de Se en los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	51
14. Medias de las unidades de catalasa en eritrocitos por grupo de estudio dentro del experimento	54
15. Unidades de Catalasa en eritrocitos de los grupos de estudio	55
16. Unidades de catalasa en eritrocitos de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	56
17. Medias de la concentración plasmática de MDA por grupo de estudio dentro del experimento	59
18. Concentración de MDA plasmática en los grupos de estudio en el experimento	60

19. Concentraciones plasmáticas de MDA en los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	61
20. Medias de la concentración plasmática de GSH por grupo de estudio dentro del experimento	64
21. Concentración de GSH plasmática en los grupos de estudio en el experimento	65
22. Concentraciones plasmáticas de GSH en los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	66
23. Medias de la concentración de GSH en eritrocitos por grupo de estudio dentro del experimento	69
24. Concentración de GSH en eritrocitos en los grupos de estudio en el experimento	70
25. Concentraciones de GSH en eritrocitos de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	71
26. Medias de las absorbancias obtenidas para IgG en suero por grupo de estudio dentro del experimento	74
27. Absorbancias para IgG en suero de los grupos de estudio en el experimento	75
28. Concentraciones de absorbancias para IgG en suero de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	76
29. Medias de los títulos de anticuerpos para hemoaglutinación indirecta de los sueros contra <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A1 por grupo de estudio dentro del experimento	79
30. Títulos para la prueba de hemoaglutinación indirecta contra <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A1 en suero de los grupos de estudio en el experimento	80
31. Títulos para la prueba de hemoaglutinación de los sueros contra <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A1 de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	81
32. Medias de los títulos para la prueba de de hemoaglutinación indirecta de los sueros contra <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2 por grupo de estudio dentro del experimento	83

33. Título de hemoaglutinación para <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2 en suero de los grupos de estudio en el experimento	84
34. Título para la prueba de hemoaglutinación de los sueros contra <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2 de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados	85

II. Índice de tablas

1. Niveles de selenio en tejidos de pequeños rumiantes	7
2. Niveles de selenio en suero, sangre completa, leche y lana de pequeños rumiantes	7
3. Peso e identificación de los animales al inicio del estudio de estudio	23
4. Composición bromatológica del alimento ofrecido a los animales	24
5. Formulación de los bolos que se utilizaron en el estudio	26
6. Cantidad de formulación aplicada a los animales durante el experimento	28
7. Mediciones hechas a bolos intrarruminales	35
8. Análisis de varianza para peso de los grupos de estudio	36
9. Suma de cuadrados tipo III para peso de los animales de estudio	37
10. Análisis de varianza para ganancia de peso de los grupos de estudio	40
11. Suma de cuadrados tipo III para ganancia de peso de los grupos de estudio	40
12. Análisis de varianza para consumo de alimento de los grupos de estudio	44
13. Suma de cuadrados tipo III para consumo de alimento de los grupos de estudio	44
14. Análisis de varianza para concentración de los grupos de estudio	48
15. Suma de cuadrados tipo III para concentración de Se en los grupos de estudio	48
16. Análisis de varianza para las unidades de catalasa en eritrocitos de los grupos de estudio	52
17. Suma de cuadrados tipo III para las unidades de catalasa en eritrocitos de los grupos de estudio	53

18. Análisis de varianza para la concentración plasmática de MDA para los grupos de estudio	57
19. Suma de cuadrados III para la concentración plasmática de MDA para los grupos de estudio	58
20. Análisis de varianza para la concentración de GSH en plasma de los grupos de estudio	62
21. Suma de cuadrados tipo III para la concentración de GSH en plasma de los grupos de estudio	63
22. Análisis de varianza para la concentración de GSH en eritrocitos de los grupos de estudio	67
23. Suma de cuadrados tipo III para la concentración de GSH en eritrocitos de los grupos de estudio	68
24. Análisis de varianza para IgG en suero de los grupos de estudio	72
25. Suma de cuadrados tipo III para IgG en suero de los grupos de estudio	73
26. Análisis de varianza para hemoaglutinación para A1 en suero de los grupos de estudio	77
27. Suma de cuadrados tipo III para hemoaglutinación para A1 en suero de los grupos de estudio	78
28. Análisis de varianza para hemoaglutinación para A2 en suero de los grupos de estudio	82
29. Suma de cuadrados tipo III para A2 en suero de los grupos de estudio	82

Abreviaturas

- Se: Selenio
- MDA: Malondialdehído
- GSH: Glutati3n reducido
- CAT: Catalasa
- ELISA: Ensayo por inmunadsorci3n ligado a enzimas
- IgG: Inmunoglobulina G
- TBARS: Especies reactivas al 1cido tiobarbit3rico
- GBSe: Grupo Bolo con Selenio
- GSeP: Grupo Selenio Parenteral
- GC: Grupo Control

Resumen

El selenio (Se) actúa como cofactor dentro de selenoproteínas en procesos de óxido-reducción en el organismo. Una deficiencia de Se tiene consecuencias en la salud de los rumiantes, como se ha visto en enfermedades directamente relacionadas, como la enfermedad de músculo blanco y la baja en la inmunidad, incrementando la mortalidad en los animales. Se evaluó la suplementación de Se en cabritos en tres grupos de estudio; un grupo fue suplementado con Se en forma oral a través de un bolo intarruminal (GBSe); un grupo se suplementó con Se de forma parenteral (GSeP); un grupo control sin tratamiento (GC). Se evaluaron parámetros productivos como ganancia de peso y consumo de alimento. Se evaluó el estrés oxidativo, a través de biomarcadores como glutatión reducido (GSH), catalasa (CAT) y malondialdehído (MDA). Se evaluó la respuesta inmunitaria a través de la medición de IgG en suero y la capacidad de hemoaglutinación a través del desafío contra *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 y A2. Los animales suplementados tuvieron mayores niveles de Se en eritrocitos a diferencia de grupo control (GC) ($P < 0.05$) pero no se observaron diferencias asociadas a la vía de administración ($P > 0.05$). El Se no tuvo efecto sobre el consumo de alimento y la ganancia de peso ($P > 0.05$). En la evaluación de CAT, GBSe tuvo mayor actividad, sin embargo, la actividad va disminuyendo en los grupos tres grupos de estudio. En la medición de la concentración de MDA no se observaron diferencias entre los grupos de estudio ($P > 0.05$). En la medición de GSH solo se observó diferencia entre grupos en plasma en los que se refiere al día de estudio ($P < 0.05$), en eritrocitos no se observaron diferencias significativas entre grupos ($P > 0.05$). Los animales suplementados tuvieron mayores absorbancias para IgG ($P < 0.05$). En la hemoaglutinación indirecta GBSe tiene mejor respuesta para el serotipo A1 ($P > 0.05$), sin embargo, no se observan diferencias para A2 ($P > 0.05$). En el presente experimento los tratamientos no tuvieron efecto sobre el consumo de alimento, y ganancia de peso. Se logró aumentar las concentraciones de Se en eritrocitos en los animales suplementados. Los marcadores de estrés oxidativo son modulados por el Se. La respuesta inmune humoral fue influenciada por la suplementación de Se.

1. Introducción

La producción animal se ve condicionada por múltiples factores, como es la nutrición animal. Algunos de los problemas nutricionales más comunes en la producción están vinculados directamente a las características geográficas y propiedades de los suelos en las diferentes áreas de pastoreo y producción de forrajes (INEGI, 2011; FAO 2012). Un ejemplo de lo anterior se observa en la pobre distribución natural de Se en suelos alrededor del mundo, deficiencia que afecta la producción, productos y subproductos de origen animal (Khanal and Knight, 2010; Spears, 2003).

1.2 Minerales

Los minerales, y dentro de estos los microelementos tienen un papel importante en la nutrición, porque aunque no proporcionan energía, son esenciales para la utilización y síntesis biológica de nutrientes, además participan en numerosas actividades metabólicas como cofactores para mantener el equilibrio fisiológico de los animales; la deficiencia de estos repercute en una mala función metabólica que debe ser corregida a través de la suplementación (Haenlein and Anke, 2011; Hefnawy and Tórtora-Pérez, 2010; Kendall et al., 2012).

1.3. Selenio

El Se fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jons Jacob Berzelius. Este mineral está clasificado como un “metaloide” que se encuentra entre el Azufre y el Telurio en el grupo VIA, y entre el Arsénico y el Bromo en el grupo 4 de la tabla periódica (Slavica and Cepelak, 2004). Es un elemento traza esencial que ha demostrado ser componente esencial de la mayoría de los organismos vivos, el cual tiene propiedades principalmente antioxidantes. Es por esto que el Se se encuentra dentro del grupo de minerales que determina la función normal de un organismo (Kruzhel et al., 2014; Marek and Stanislaw, 2013).

El mineral es ingerido por los animales (particularmente los herbívoros) a través de las plantas, las cuales lo toman del suelo en donde crecen. Los niveles de Se dependen entonces principalmente de la cantidad de mineral que haya en la dieta, que a su vez tiene que ver con el contenido de Se en el suelo que incorpora la planta a través de aminoácidos como selenometionina y selenocisteína. De esta forma se genera un ciclo para el Se en el que tienen que ver el suelo, la planta y el animal (McKenzie et al., 1998; Slavica and Cepelak, 2004; Tapiero et al., 2003). Es importante mencionar que el contenido de Se en los suelos varía en las diferentes formaciones geológicas alrededor del mundo. Además, la forma de Se en suelos depende de factores físicos, químicos y biológicos, entre las que se encuentran las formaciones de rocas, descomposición, lixiviación, escurrimiento de yacimientos minerales naturales y formaciones debajo de los mantos freáticos (Holben and Smith, 1999). El contenido de Se en suelo por debajo de 0.010 mg/kg de materia seca puede causar signos de deficiencia en los animales. Cantidades <0.5 mg/kg en suelos o < 0.1 ng/kg en plantas son consideradas insuficientes para los animales (Hefnawy and Tórtora-Pérez, 2010; Kruzhel et al., 2014). Cabe destacar que el Se no está uniformemente distribuido en el ambiente, existen áreas con suelos que son pobres en el elemento (Kruzhel et al., 2014). La mayor parte de los suelos alrededor del mundo tienen un bajo contenido del elemento y entre ellos se encuentra México, principalmente en la zona del altiplano (J. E. Ramírez-Bribiesca et al., 2001).

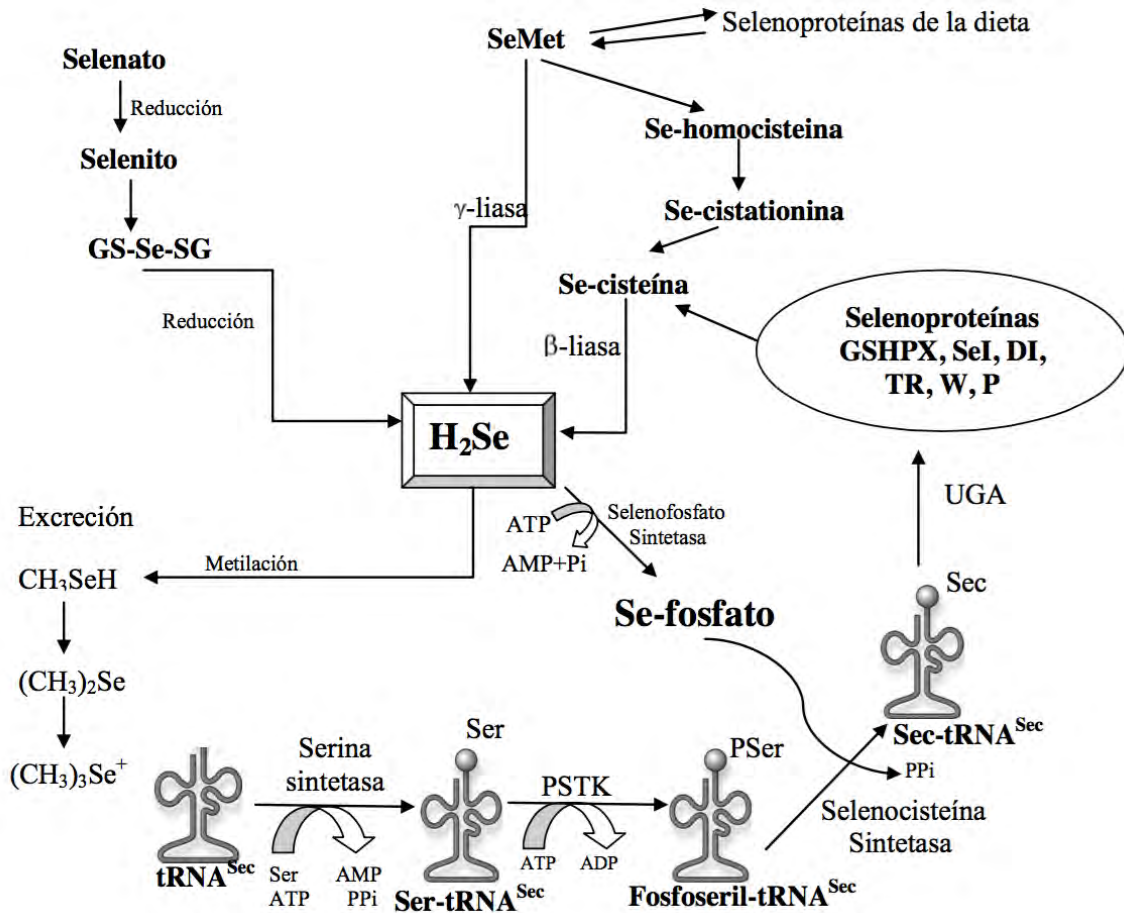
1.3.1 Absorción y metabolismo del selenio

Se conoce que la absorción de Se en rumiantes varía del 11 al 35%, mientras que en no rumiantes es de 77 al 85% (Hefnawy and Tórtora-Pérez, 2010; Kruzhel et al., 2014; Lescure et al., 2009; Silva et al., 2000). La baja absorción se atribuye a que en el rumen el Se se transforma a formas poco asimilables para el animal (Galbraith et al., 2015; Ghany-Hefnawy et al., 2007; Whanger et al., 1978).

La absorción del Se ocurre en el duodeno y el íleon. La selenometionina es absorbida por la vía de la metionina (transporte activo), la selenocisteína unida a una proteína y las sales inorgánicas se absorben por difusión pasiva (Juniper et al., 2009a; Rosen and Liu, 2009; Silva et al., 2000).

El metabolismo ruminal y la absorción intestinal de selenato y selenito difieren entre sí. Parte de selenato consumido por el rumiante es reducido a selenito en el rumen, otra parte pasa el rumen y es absorbido en el intestino delgado. Por otro lado, el selenito en el rumen puede convertirse en formas insolubles de bajo peso molecular que no son disponibles para el animal, aunque pueden ser utilizadas por la microbiota ruminal, para sintetizar tanto selenometionina y/o selenocisteína, siempre y cuando las condiciones ruminales, no lo reduzcan, haciéndolo no disponible tanto a la microbiota, como para el animal. Una parte del selenito es usado para integrarse a aminoácidos como la selenocisteína. Por último, los aminoácidos selenificados son absorbidos en el duodeno (Ghany-Hefnawy et al., 2007; Gresakova et al., 2013; Juniper et al., 2009a).

Figura 1. Metabolismo de las diferentes formas de suplementación de selenio (Rodríguez, 2013)



1.3.2 Distribución

Después de la absorción, el Se es utilizado en la síntesis de selenoproteínas acoplado a la selenocisteína, almacenado a través de la selenometionina o excretado por diferentes vías (Holben and Smith, 1999; Juniper et al., 2009a). Cuando el Se es absorbido, es transportado principalmente por plasma, posteriormente es incorporado a células como eritrocitos, leucocitos, proteínas como la mioglobina, nucleoproteínas, miosina y varias enzimas; por el sistema porta es transportado al hígado, donde una fracción se queda en los hepatocitos, la parte sobrante es transportada mediante la circulación a los diferentes órganos donde se almacena (Gresakova et al., 2013). Se ha encontrado que la distribución de Se tiene una jerarquización donde la mayor concentración de Se se encuentra en el riñón,

después en el hígado, el corazón y la concentración más baja en músculo esquelético (Juniper et al., 2009b). Dentro de la distribución muscular el corazón contiene mayor concentración de Se que la de los músculos esqueléticos; los tejidos intestinales y pulmones pueden ser relativamente ricos de este mineral, mientras que su contenido es bajo en tejido nervioso y adiposo (Awadeh et al., 1998; Berry, 2005; Qin et al., 2007).

1.3.3. Excreción del selenio

La pérdida de Se se efectúa por pulmones, heces y orina. La porción que se excreta por cada vía depende de la ruta de administración, los niveles tisulares y la especie animal. El Se administrado por vía oral se excreta por las heces en mayor cantidad. Conforme la ingesta de Se disminuye, la excreción de metabolitos de selenuro en la orina disminuye y viceversa. En caso de alta ingestión, se exhalan formas volátiles. El Se inyectado se excreta principalmente por la orina. Por último, la cantidad de Se excretada por bilis es pequeña (Kuehnelt et al., 2007; Neathery et al., 1990; Ohta and Suzuki, 2008).

1.4. Funciones del selenio

El Se es esencial en la producción animal, ya que tiene que ver con el desarrollo normal y la prevención de enfermedades (Lescure et al., 2009; McKenzie et al., 1998). Además, es importante para mejorar los procesos productivos previniendo patologías relacionadas con la deficiencia de Se (Hefnawy and Tórtora-Pérez, 2010).

Se sabe que la principal función de este mineral se realiza a través de las selenoproteínas, que actúan de forma general en reacciones de óxido-reducción (Kasaikina et al., 2012; Kruzhel et al., 2014; Lescure et al., 2009; Rahmanto and Davies, 2012). De esta forma el Se participa en la respuesta inmune, en la espermatogénesis, en procesos de crecimiento y desarrollo, en la regulación y eficiencia de la mayoría de los procesos productivos, defensa contra el daño oxidativo y regulación de hormonas tiroideas (Holben and Smith, 1999; Kumar et al., 2009; Ramírez-Bribiesca et al., 2005; Revilla-Vázquez et al., 2008).

Algunos estudios en animales han reportado una relación positiva entre los niveles de Se y la resistencia a enfermedades, los animales deficientes parecen ser más susceptibles a enfermedades inducidas de forma experimental (Kumar et al., 2009).

1.5. Deficiencia de selenio

Bajas concentraciones de Se se han vinculado a problemas productivos y reproductivos (Celi, 2010; Mahmoud et al., 2013). Esta deficiencia de Se puede ser debida a una restricción en la dieta o una baja absorción en el tracto gastrointestinal, como en el caso de los rumiantes. Entre los efectos de la deficiencia de Se sobre la eficacia productiva están: menores ganancias de peso, menor producción de leche y lana, menor fertilidad con baja calidad seminal, animales débiles, abortos y retención placentaria (Haenlein and Anke, 2011; Hefnawy and Tórtora-Pérez, 2010).

Se ha observado que el Se tiene efectos sobre la respuesta inmune en los animales (Arthur et al., 2003; Finch and Turner, 1996; Gill and Walker, 2008) En modelos animales, la deficiencia de Se se ha traducido en depresión tanto de la inmunidad innata como la inmunidad celular (Slavica and Cepelak, 2004). Mientras que, en animales en crecimiento, la deficiencia de Se ha demostrado tener un desarrollo desigual en los linfocitos (Combs and Gray, 1998).

La deficiencia ocurre cuando los suelos son pobres en Se; se consideran niveles insuficientes en el suelo cantidades menores a 0.5 mg/kg o bien en las plantas cantidades menores a 0.1 ng/kg. Como era de esperar, se han establecido correlaciones entre la presencia de Se en suelo, las plantas y los tejidos animales en donde se determinan los valores deficientes, marginales y adecuados para distintas partes del organismo animal dependiendo de la dieta (ver Tabla 1) (Puls, 1988).

En suelos con niveles adecuados de Se, la presencia de otros minerales como: calcio, azufre cobre y arsénico, pueden interferir en la incorporación en la planta, y la presencia en la dieta de estos mismos elementos o de grasas polinsaturadas o nitratos, reducen su absorción en el intestino delgado (Ghany-Hefnawy et al., 2007).

Tabla 1. Niveles de selenio en tejidos de pequeños rumiantes (Puls, 1988)

	Dieta*	Hígado**	Riñón**	Músculo**
Deficientes	0.02-0.10	0.01-0.10	0.05-0.60	0.01-0.03
Marginales	0.10-0.25	0.15-0.25	0.70-1.10	0.03-0.09
Adecuados	0.40-1.00	0.25-1.50	0.90-3.00	0.09-0.40
Altos	3.00-5.00	2.00-10.0	4.00-6.00	0.40-0.60
Tóxicos	5.00-25.00	15.0-30.00	6.00-15.00	0.60-20.00

* ppm peso seco** ppm peso húmedo

También se han determinado los niveles en diferentes líquidos de los pequeños rumiantes como suero, sangre, leche y algunas estructuras como la lana en el caso de los ovinos (ver Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de selenio en suero, sangre completa, leche y lana de pequeños rumiantes (Puls, 1988)

	Suero*	Sangre completa*	Leche*	Lana**
Deficientes	0.006-0.0:30	0.003-0.040	0.002-0.020	0.03-0.30
Marginales	0.030-0.060	0.040-0.080	0.020-0.030	0.06-0.08
Adecuados	0.080-0.500	0.150-0.500	0.025-0.250	0.08-4.00
Tóxicos	3.00-?	¿?	¿?	¿?

* ppm peso seco, ** ppm peso húmedo, ¿? Se desconoce

1.5.1. Enfermedades relacionadas a la deficiencia de selenio en rumiantes

Se ha demostrado que la deficiencia de Se en rumiantes, es causa de diversas enfermedades como: distrofia muscular nutricional, anemia, mastitis, retención placentaria, infertilidad y pérdida de peso. También se ha reconocido que la deficiencia de Se es muy extensa y económicamente más importante que su toxicidad, porque el Se es un elemento traza esencial para el crecimiento y salud de los animales, está presente en todas las células y es necesario para mantener las funciones vitales tanto en humanos como en animales (Pavlata et al., 2012)

1.5.1.1 Distrofia muscular nutricional o enfermedad de músculo blanco

Es el principal signo causado por la deficiencia de Se; es la consecuencia de un daño en las membranas de los miocitos; se puede presentar en la mayoría de los animales, aunque de modo más frecuente en animales jóvenes cuyas madres consumieron una ración carente de Se durante la gestación (J E. Ramírez-Bribiesca et al., 2001; Sobiech and Kuleta, 2002, Rodríguez, 2013).

En animales selenodeficientes los fosfolípidos de la membrana de los miocitos sufren una peroxidación, causando daño y mal funcionamiento a las proteínas de membrana. La principal consecuencia de la lesión celular es el incremento de la permeabilidad de calcio, el cual se acumula causando daño, y por lo tanto, pérdida de la funcionalidad muscular (Karami et al., 2011, Rodríguez, 2013).

La distrofia muscular se puede manifestar de manera aguda o crónica; la forma aguda se caracteriza por muerte del animal en pocas horas. Los signos comúnmente observados son anomalías al caminar, temblor muscular y alteraciones cardíacas, disminución del tono muscular. En el altiplano mexicano la enfermedad del músculo blanco es considerada la principal causa de muerte en cabritos (J E. Ramírez-Bribiesca et al., 2001, Rodríguez, 2013).

1.5.1.2 Anemia

En animales selenodeficientes se ha observado anemia y cuerpos de Heinz asociados a la baja actividad de las enzimas antioxidantes de los eritrocitos y la consecuente destrucción celular (Stefanowicz et al., 2013, Rodríguez, 2013).

1.5.1.3. Mastitis

Se sabe que la deficiencia de Se y la baja actividad de la selenoenzima glutatión peroxidasa condicionan la actividad fagocítica de los leucocitos en enfermedades como la mastitis, causando proliferación bacteriana y daño a la glándula mamaria. Se ha demostrado que la suplementación con este micronutriente aumenta la eficacia de la fagocitosis por parte de neutrófilos y macrófagos eliminando de forma eficaz a los patógenos que puedan colonizar esta estructura anatómica (Montes, 1998, Rodríguez, 2013).

1.5.1.4. Retención placentaria

La selenodeficiencia puede llevar a un incremento en la retención placentaria en un hato (Smith et al., 1984). De forma normal el tejido placentario normal ejerce una fuerte actividad quimiotáctica sobre los leucocitos, los cuales tienen que ver con la separación de la placenta después del parto. Si la actividad quimiotáctica sobre los leucocitos es deficiente o retardada, se producirá la retención placentaria, la cual contribuye a la infección del útero, dañando la capacidad de gestación (Lekatz et al., 2010; Silva et al., 2000, Rodríguez, 2013).

1.5.1.5. Respuesta inmune comprometida

La deficiencia de Se es bien conocida por deprimir tanto la respuesta inmune humoral, como la respuesta celular. En lo que se refiere a la respuesta inmune humoral, se ha observado el aumento de la IgG calostrual en vacas criadas para producir carne suplementadas con el mineral, así como un aumento en la respuesta de los anticuerpos contra antígenos en becerros destetados suplementados con Se (Rose et al., 2012).

Kumar y sus colaboradores encontraron que al suplementar ovejas con Se y después exponerlas a un agente bacteriano, la respuesta inmune humoral aumenta significativamente con respecto al grupo control (Kumar et al., 2009).

Los fagocitos contienen glutatión peroxidasa (GSHPx) en los lisosomas. Un déficit nutricional de Se produce la declinación de la actividad de la GSHPx en estas células y por lo tanto la habilidad para destruir al antígeno fagocitado (Finch and Turner, 1996; Forman and Torres, 2002; Ndiweni and Finch, 1996).

La función óptima de linfocitos B, particularmente la síntesis de inmunoglobulinas, una vez que la célula se diferencia en una célula plasmática productora de anticuerpos, es dependiente del funcionamiento óptimo de células presentadores de antígenos como macrófagos y linfocitos T CD4⁺ Th2, responsable de la respuesta inmune humoral. Por ello, se infiere que algunos efectos del Se sobre inmunidad humoral pueden ser secundarios al efecto sobre linfocitos T CD4⁺ Th2 y macrófagos, así, el Se es requerido para el desarrollo y la expresión de este tipo de respuesta inmune (Kendall et al., 2012; Rodríguez, 2013).

1.6. Suplementación de selenio

La suplementación de Se es importante en los animales para la prevención de enfermedades y disturbios nutricionales relacionados con la deficiencia del elemento (Marek and Stanislaw, 2013; Van Ryssen et al., 2013).

La principal fuente de Se para los rumiantes se encuentra en la dieta, si la cantidad de Se en los forrajes es baja, consecuentemente la concentración en la dieta puede ser deficiente para el animal, por lo tanto, la necesidad de un suplemento de Se es requerida (Juniper et al., 2009a).

La suplementación de Se en rumiantes considerada por la FDA permite hasta un límite superior de 0.3 ppm (partes por millón) en las dietas del ganado, en el caso de ovejas y cabras, específicamente se ha establecido de 0.1 a 0.3 ppm/kg de materia seca de Se en la dieta. El NRC estableció un requerimiento nutricional de Se en cabras de 0.2 mg/kg de materia seca (NRC, 2007).

1.7. Tratamiento y prevención de la deficiencia de selenio en pequeños

rumiantes (Puls, 1988):

- Selenito de sodio inyectable cada 2-3 meses.
- Dosis oral terapéutica:
 - 1 mg Se/kg de peso/semana.
 - 5 mg Se/kg de peso/mes.
- Selenito de bario inyectable (100 mg Se/oveja o 1-2 mg/kg de peso) muestra ser eficiente como tratamiento de larga duración (6 meses - 2 años) para ovejas, pero los residuos en el sitio de inyección se observan en la carne.
- Suplementar o inyectar a las ovejas y carneros 3-4 semanas antes de la época de apareamientos y 3-4 semanas antes del parto.
- Sales selenizadas a libre acceso (12-15 g/cabeza/día) o una mezcla de minerales que contenga Se de 30-100 ppm.
- Añadir Se en mezcla mineral a la ración de grano cuando se alimenta particularmente en la época de cría.
- La aplicación de Se al suelo (fertilización con Se), aunque no resulta eficiente en términos de la cantidad precisa para cubrir las necesidades en los animales.
- Se en agua, al igual que en el alimento depende de los consumos individuales para contrarrestar la deficiencia.
- Implantando en la base de la oreja, núcleos que liberan Se con lentitud.

1.8. Toxicidad del selenio en pequeños rumiantes (Puls, 1988):

- LD₅₀ Selenito de sodio:
 - Intramuscular 0.45-0.70 mg/kg de peso.
 - Parental 5.00 mg/kg de peso.
 - Oral 10-15 mg/kg de peso.
- Dosis toxica crónica - 0.08 mg Se/kg de peso/día por 1 año.

1.8.1. Signos de toxicidad por selenio ingerido (Puls, 1988):

- Anorexia y molido de dientes. Terminalmente descarga mucoide de la nariz y membranas mucosas cianóticas.
- Los ovinos no muestran signos de enfermedad del álcali pero exhibirán tambaleos ciegos si son alimentados con especies de Astragalus.

1.9. Métodos de suplementación y administración de fármacos y minerales

La suplementación en los animales deficientes de Se tiene múltiples beneficios en la producción animal, esta puede ser de dos formas: sales minerales inorgánicas (Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 , BaSeO_4 , K_2SeO_3) o formas orgánicas (levadura enriquecida, Selenometionina), puede llevarse a cabo incorporando el elemento en la dieta, en agua, suplementos minerales, soluciones inyectables o formas de liberación prolongada como los bolos intrarruminales. Las formas orgánicas parecen ser re-utilizadas más eficientemente que las formas inorgánicas, porque la selenometionina sustituye de forma no específica a la metionina en proteínas, aunque esta no tiene actividad biológica como la selenocisteína (Lopez-Arellano et al., 2015; McKenzie et al., 1998).

Los principales métodos para la suplementación tanto de Se como de fármacos como la sulfametazina incluyen (Hall et al., 2009):

- Premezclas para adicionar a alimentos concentrados
- Inyecciones (parenteral)
- Bolos intrarruminales

Dentro de las medidas que se toman actualmente para la suplementación de Se, se buscan estrategias de seguridad para prevenir la toxicidad y que estos sean fácilmente administrados, económicos y efectivos. Para lograr lo anterior se ha propuesto el uso de bolos intrarruminales de Se de liberación prolongada que aseguran una liberación gradual en el rumen por un tiempo definido (Lopez-Arellano et al., 2015).

Así, una correcta suplementación se verá reflejada en el organismo, donde los niveles de Se en sangre pueden ser un indicador de la suplementación de este elemento en rumiantes (intravitalmente), así como la medición de estos niveles en otros órganos (Kruzhel et al., 2014).

1.9.1. Bolos intrarruminales

Los bolos intrarruminales son una forma farmacéutica veterinaria ampliamente utilizada. Se consideran una forma eficaz de dosificación para los rumiantes ya que tienen la ventaja de poder transportar grandes dosis de fármaco o minerales en un pequeño espacio. Son relativamente fáciles de administrar de forma manual a través de la cavidad oral, donde son retenidos en el retículo-rumen (Edwards et al., 2011; Vandamme and Ellis, 2004).

Con la administración de los bolos se busca un método que pueda dosificar con precisión, reducir la frecuencia del tratamiento y la mano de obra para el manejo de los animales y que disminuya la incidencia de estrés hacia el animal. Debido a las características fisiológicas del tracto digestivo de los rumiantes proporcionan una oportunidad única para la tecnología de liberación prolongada, por su habilidad de retención en el retículo/rumen (Kendall et al., 2001; Olvera et al., 2006; Vandamme and Ellis, 2004).

1.10. Selenio y balance oxidativo

Una situación relacionada a la suplementación de Se, es el balance oxidativo, ya que como se mencionó, la mayoría de las selenoproteínas tienen una función antioxidante, por lo que, a través de la medición de indicadores de estrés oxidativo se puede valorar el efecto del Se en los organismos (Hawkes and Alkan, 2010).

Cuando hay un incremento de radicales libres que no pueden ser regulados por los sistemas enzimáticos y moléculas antioxidantes, estos atacan las membranas y células, alterando la función de estas. Este desbalance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros se denomina “estrés oxidativo”. Una consecuencia del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son producidas por organismos vivos como resultado del metabolismo celular normal, que, a concentraciones bajas o moderadas, tienen funciones en los procesos fisiológicos de todos los organismos vivos. Cabe mencionar que, factores ambientales como la contaminación, radiación y/o fármacos e incluso la inflamación genera estrés oxidativo a través de los procesos de erradicar la infección y tejido dañado propiciando la producción de ERO en cantidades excesivas (McKenzie et al., 1998), las cuales al ser moléculas altamente reactivas, pueden dañar las estructuras moleculares de los carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, alterando su función y produciendo daños en la estructura y función celular. La regulación del estado reductor y oxidativo es crítica para la viabilidad celular, activación y proliferación, y por lo tanto, la correcta función de los órganos (Birben et al., 2012; Grotto et al., 2009; Nazifi et al., 2009; Rahmanto and Davies, 2012).

Si los sistemas antioxidantes no funcionan correctamente habrá daño celular las cuales se pueden producir por el rompimiento de una unión covalente, adición de electrones a una molécula o la remoción de hidrógeno u otros radicales. Son especies altamente reactivas y actúan como especies electrofílicas o agentes oxidantes (Grotto et al., 2009). Las 3 EROs que tienen significancia fisiológica son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$).

Estos radicales libres se generan durante los pasos intermediarios de la reducción del oxígeno molecular (Birben et al., 2012; Nazifi et al., 2009).

Otros radicales libres derivados del oxígeno son los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Las formas simples de estos radicales son los radicales hidroxilo ($\text{HOO}\cdot$), los cuales tienen un papel en la peroxidación de los ácidos grasos. Estos radicales pueden disparar la cadena de reacciones de la lipoperoxidación por la abstracción de un átomo de hidrógeno de la cadena lateral del carbón metileno. El radical lipídico reacciona con el oxígeno para producir una radical peroxilo, este inicia una reacción en cadena y transforma los ácidos grasos polinsaturados en hidroperóxidos lipídicos, estos son muy inestables y fácilmente se descomponen en productos secundarios como los aldehídos (como el 4-hidroxilo-2,3-nonenal) y malondialdehídos (MDAs) (Birben et al., 2012), es por esto que las ERO pueden inducir la peroxidación de los lípidos (fenómeno conocido como lipoperoxidación), afectando la membrana, particularmente sobre sus receptores y enzimas unidos a ella, incrementando la permeabilidad de esta. Los productos de esta lipoperoxidación, como el malondialdehído (MDA) y los aldehídos insaturados, capaces de inactivar proteínas celulares formando puentes cruzados entre estas (Birben et al., 2012; Grotto et al., 2009), fragmentación de la cadena peptídica, alteración de la carga eléctrica y oxidación de aminoácidos específicos y con esto llevar a una proteólisis (Birben et al., 2012).

En los sistemas fisiológicos existen diferentes líneas de defensa contra estas especies reactivas de oxígeno, controlada por un sistema que incluye: eliminadores de radicales/oxidantes de bajo peso molecular (ejemplo: ácido ascórbico, tocoferoles, uratos, tioles). Dentro de las enzimas, se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y piridoxinas, enzimas de reparación (ejemplos: reductasas de metionina sulfóxido (MetSO), reductasas de disulfuro, sulfiredoxinas) y enzimas y organelos que remueven el daño no reparable (ejemplos: proteosomas, lisosomas, enzimas de reparación del

DNA, fosfolipasas). Dentro de las defensas no enzimáticas se encuentra el glutatión reducido (GSH) (Nazifi et al., 2009; Rahmanto and Davies, 2012).

Otro componente del sistema antioxidante del organismo son las selenoproteínas, las cuales se encuentran en todas las células del organismo, actualmente se conocen cerca de 30 selenoproteínas, donde se ha observado que la mayoría parece catalizar reacciones de óxido-reducción (Haenlein and Anke, 2011; McKenzie et al., 1998). La habilidad de las selenoproteínas para proteger al organismo del daño oxidativo es considerada de vital importancia, ya que muchos de los sistemas de defensa del organismo están ligados a los efectos microbicidas de macrófagos y neutrófilos los cuales generan radicales libres en la respuesta inmune (McKenzie et al., 1998).

Una forma indirecta de medir el estrés oxidativo es a través de conocer concentración de antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), que es un tripéptido (γ -glutamil-cisteinglicina) antioxidante no enzimático que se encuentra dentro del grupo de los tioles. Dentro de sus funciones es cofactor para varias enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Birben et al., 2012; Nazifi et al., 2009; Silva et al., 2000). Es altamente abundante en todos los compartimentos celulares y es el mayor antioxidante soluble. GSH muestra sus efectos antioxidantes de diferentes maneras; detoxifica peróxidos de hidrogeno y lipoperóxidos a través de GSH-Px. El GSH dona su electrón para reducir al H_2O_2 en H_2O y O_2 . GSSG es otra vez reducido a GSH por medio de la enzima GSH reductasa la cual usa al NADPH como donador de electrones. El glutatión reducido dona protones a la membrana y las protege del ataque oxidante (Birben et al., 2012). El GSH también convierte la vitamina C y E de regreso a sus formas activas, además protege a la célula de la apoptosis interactuando con señalizadores proapoptóticos y antiapoptóticos, regula y activa diversos factores de transcripción, como AP-1, NF- κ B y Sp-1 (Birben et al., 2012). La proporción entre el glutatión reducido y el oxidado (2GSH/GSSG) es un importante determinante de estrés oxidativo en el organismo (Birben et al., 2012).

En el caso de la actividad de la glutatión peroxidasa, el GSH actúa reduciendo el ácido selénico (R-SeOH), producto de la activación del grupo selenol de la enzima, produciendo (R-SeS-G) y otro GSH lo convierte a su estado inicial selenol (R-SeH) con la formación concomitante de disulfuro (GSSG) que será reducido por la glutatión reductasa (Rahmanto and Davies, 2012). La deficiencia de Se afecta el metabolismo de glutatión (GSH), incrementando sus síntesis y liberación en el hígado con el concomitante incremento en plasma. El incremento de GSH plasmático puede llevar a una depleción de cisteína y con esto la síntesis de proteínas puede verse afectada (Tapiero et al., 2003).

Otra forma de evaluar el estrés oxidativo es a través de la medición de productos de degradación de la oxidación de moléculas como es el MDA, el cual es un aldehído de bajo peso molecular de tres carbonos. Se postula que su formación está basada en el hecho de que solo los peróxidos que poseen una insaturaciones α o β para el grupo peróxido pueden ser capaces de llevar a cabo un ciclo de reacciones para finalmente generar MDA (Grotto et al., 2009).

El blanco para las especies reactivas, en este caso, es un ácido graso polinsaturado de doble enlace carbón-carbón. Este doble enlace debilita la unión hidrógeno-carbón, lo que permite el retiro del hidrógeno por un radical libre. Entonces, un radical libre puede retirar un átomo de hidrógeno y así se forma un radical libre, el cual sufre una oxidación generando un radical peroxilo. El radical peroxilo puede reaccionar con otros ácidos grasos polinsaturados, retirando un electrón produciendo un hidroperóxido lipídico y otro radical libre lipídico. Este proceso se puede propagar continuamente en una reacción en cadena. El hidroperóxido lipídico es inestable y el producto de su fragmentación son el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal (Grotto et al., 2009).

Una cantidad considerable de MDA puede provenir de las siguientes fuentes: ácidos grasos con menos de tres dobles enlaces. En este caso, la producción de MDA es parcialmente debida a la oxidación secundaria de compuestos carbonilos primarios; endoperoxidos involucrados en la síntesis de prostaglandinas; degradación oxidativa de aminoácidos dependiente de hierro, carbohidratos, pentosas y hexosas y a partir de productos de los radicales libres por la irradiación gamma (Grotto et al., 2009). Cabe mencionar que el malondialdehído (MDA) también se produce como resultado de la biosíntesis de las prostaglandinas. Una de las principales importancias del MDA, es que reacciona con el DNA a pH fisiológico para formar aductos para la deoxiguanosina, deoxiadenosina y deoxicitidina, estos aductos son mutagénicos (Grotto et al., 2009; Marnett, 2002). Así, la lipoperoxidación parece ser la principal fuente de daño endógeno al DNA, que puede contribuir a la aparición de cáncer y otras enfermedades genéticas (Marnett, 2002).

La medición de MDA se puede hacer en una gran variedad de muestras biológicas. El uso de del ácido tiobarbitúrico (TBARS) que reacciona con el MDA se ha utilizado para medir este compuesto en plasma, suero, diferentes tejidos como el músculo, cerebro, hígado, pulmón, riñón, corazón y ocasionalmente orina, aunque esta última no tiene gran significancia para determinar lipoperoxidación (Grotto et al., 2009).

Se puede ver entonces que el estrés oxidativo se puede medir a través de moléculas no enzimáticas, productos de degradación, pero también se puede medir a través de la medición de la actividad enzimática que esté relacionada con la respuesta antioxidante, es por esto que se puede medir a la enzima catalasa, la cual es una enzima antioxidante que degrada el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Iwase et al., 2013). Esta enzima existe como tetrámero compuesto de 4 monómeros idénticos, cada uno de ellos contiene un grupo heme en su sitio activo (Birben et al., 2012) que cataliza el rompimiento del peróxido de hidrógeno en

oxígeno y agua. La degradación del H_2O_2 se lleva a cabo vía conversión entre dos conformaciones de catalasa-ferricatalasa (hierro coordinado para agua) y el compuesto 1 (hierro acomplejado con un átomo de oxígeno). Catalasa también une al NADPH como equivalente reductor para prevenir la inactivación oxidativa de la enzima (formación del compuesto 2) por el H_2O_2 mientras este es reducido a agua (Birben et al., 2012).

2. Justificación

En gran parte del territorio mexicano existe una deficiencia de Se en suelos, lo cual repercute en la producción ganadera, específicamente en rumiantes, debido a que los forrajes con los que se alimenta a los animales presentan una carencia de este mineral. Esto conlleva a diferentes trastornos en estos animales, y esto es más evidente en los pequeños rumiantes con la enfermedad de músculo blanco, además de los trastornos productivos y reproductivos por la carencia de este mineral, afectando también la respuesta inmunológica y el balance oxidativo. Por estos motivos es necesario la suplementación del mineral a través de formas farmacéuticas para mejorar el balance del Se. La suplementación parenteral requiere de inversiones en equipo y mano de obra; los bolos intrarruminales requieren de una sola administración, menor estrés al animal y una liberación prolongada a través del tiempo, por lo que por medio de la bolos intrarruminales con Se administrados a pequeños rumiantes se espera mejorar los esquemas de suplementación animal en lo que se refiere a manejo, dosis, tiempo de suplementación y logrando modular respuestas antioxidantes y así contribuyendo a la inmunidad en rumiantes suplementados.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar bolos intrarruminales cargados con Se sobre los indicadores de estrés oxidativo e indicadores de la respuesta inmune.

3.2. Objetivos particulares

1. Mejorar los esquemas de administración de Se a nivel de producción pecuaria, para aumentar la calidad y rendimiento de productos en rumiantes.
2. Evaluar el balance entre el Se administrado y el cuantificado en eritrocitos.
3. Cuantificar los niveles de inmunoglobulinas en suero y correlacionarlos con los niveles de Se.
4. Evaluar indicadores de estrés oxidativo (Glutación, niveles de MDA y actividad de catalasa) en eritrocitos o plasma.

4. Hipótesis

La suplementación de Se con bolos intrarruminales, logrará modular las respuestas antioxidantes por más tiempo y de esta forma contribuirá a la respuesta inmune en rumiantes suplementados con el mineral.

5. Materiales y métodos

5.1. Norma de ética y bienestar experimental

Los animales utilizados para este trabajo fueron manejados bajo las normas del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) aprobado por la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (FESC-UNAM), con clave de registro CICUAE-FESC C15_03.

5.2. Localización

Los trabajos se realizaron dentro del Área de Experimentación Animal de la Coordinación General de Estudios de Postgrado en el Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 de la Universidad Nacional Autónoma de México, municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México y dentro de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en el Laboratorio 5 de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4.

5.3. Animales

Se emplearon 20 caprinos (19 machos y una hembra) de raza alpina, de 6-8 meses de edad aproximadamente, con un peso promedio de 22.914 kg y una desviación estándar de 4.1456 kg, procedentes del módulo de producción caprina de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Previo al estudio los animales tuvieron un periodo de adaptación alojándose en corrales; cada corral fue acondicionado con una cama de viruta en una superficie de 7 m². El alimento y el agua se ofrecieron *ad libitum* una vez al día. Los animales se desparasitaron con Closantel a una dosis de 10 mg/kg PV. Posteriormente los animales se alojaron en jaulas metabólicas individuales con 1.20 de largo 0.5 m de ancho y 1.2 m de alto; los animales se dividieron en tres grupos de estudio como muestra la tabla 3.

Tabla 3. Peso e identificación de los animales al inicio del estudio de estudio

Animal	Grupo de estudio	Peso inicial	Promedio por grupo	Desviación estándar por grupo
1	Grupo control	24.12	24.25	2.71
2		23		
3		21.3		
4		29.28		
5		24.54		
6		23.26		
7	Grupo Bolo con Selenio	21.44	21.93	3.82
8		26.46		
9		19.34		
10		22.12		
11		15.84		
12		21.62		
13	26.72			
14	Grupo Selenio Parenteral	26.3	22.75	5.55
15		20-32		
16		12.72		
17		26.94		
18		26.98		
19		26.86		
20	19.12			
Promedio del total de animales		22.914		
Desviación estándar del total de animales		4.146		

5.4. Alimentación

Durante el experimento a los cabritos se les alimentó con alfalfa achicalada molida, la cual se administraba diariamente a cada animal. El alimento contenía 1.11 $\mu\text{gSe/g}$ de muestra de alimento. Se realizó un análisis químico proximal para conocer la composición del alimento administrado a los animales en el laboratorio de bromatología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, la composición del alimento se puede observar en la tabla 4:

Tabla 4. Composición bromatológica del alimento ofrecido a los animales

Composición	Base tal como enviado	Base seca
Materia seca	94.13	100.00
Humedad total	5.87	0.00
Extracto etéreo	2.95	3.14
Cenizas	13.73	14.58
Proteína cruda	19.55	20.76
Fibra cruda	19.8	21.04
Extracto libre de nitrógeno	38.10	40.49
Fibra detergente neutro	30	32.03
Fibra detergente ácido	25.41	27.12
Lignina	5.81	6.20
Hemicelulosa	4.59	4.9

El agua (potable) se ofreció en una cubeta de tres litros la cual era cambiada de forma diaria para mantener la limpieza del agua y del recipiente utilizado.

5.5. Peso y ganancia de peso de los animales de estudio

Se hizo la medición del peso y de la ganancia de peso de cada uno de los animales involucrados en el estudio. Los animales se pesaron semanalmente previo

al inicio del estudio por la mañana antes de recibir alimento (ayunas), utilizando una balanza de 100 kilogramos de capacidad marca Torey®.

5.6. Consumo de alimento

La evaluación del consumo se realizó individualmente y por grupo de estudio, esta se hizo previo al inicio del estudio y de forma semanal, en donde se ofreció diariamente en promedio 1.5 kg de alimento por animal. La estimación del consumo de alimento se calculó restando el peso del alimento al inicio de la semana, menos la cantidad de alimento restante, a este valor se le restaba el rechazo de alimento dejado por el animal en el comedero para saber el consumo real por animal y posteriormente por grupo.

(Cantidad de alimento al inicio de la semana – Cantidad de alimento al finalizar la semana) = Consumo

(Consumo – Rechazo de alimento no consumido) = Consumo real

5.7. Bolos intrarruminales

Se elaboraron bolos con selenito de sodio dentro de su formulación considerando un promedio general de peso 22 kilogramos en los animales utilizados para este estudio.

La elaboración de los bolos de Se y placebo se realizó mediante granulación por fusión (Amador, 2005).

Se consideró para la elaboración de los bolos la dosis de Se recomendada por el *National Research Council* (NRC, 2007) de 0.56 miligramos de Se por kilogramo de materia seca y un consumo de alimento por animal del 3% de materia seca. Por lo tanto, cada bolo tuvo un peso aproximado de 8 gramos con una cantidad de Se de 50 miligramos por bolo.

Se fabricó un lote de bolos en base a la formulación de la tabla 5, la fuente de Se fue selenito de sodio, un excipiente lípidico que controló la liberación, un agente densificador para lograr una densidad 2-3.5g/ml para evitar la regurgitación.

Tabla 5. Formulación de los bolos que se utilizaron en el estudio

Formulación	Porcentaje en la formulación (%)	Excipiente por bolo (g)	Gramos por lote elaborado (g)
Selenito de sodio	0.625	0.05	4
Cutina	25	2	160
Hierro	73.375	5.87	469.6
Estearato de Magnesio	0.5	0.04	3.2
Talco	0.5	0.04	3.2
Total	100	8	640

5.7.1. Evaluación de los bolos fabricados, vía granulación por fusión

- a) Dimensiones: Se utilizó un micrómetro digital Mitutoyo modelo CD-6 CS para medir el largo, ancho y espesor de 10 bolos de cada lote fabricado.
- b) Densidad: Se utilizó una probeta graduada de 25 mL, la cual se llenaba con agua hasta una marca conocida, el bolo es previamente pesado, es colocado en la probeta y se mide el volumen desplazado de agua.
- c) Dureza: Utilizando el durómetro Vankel para determinar la dureza a 10 bolos de cada lote.

5.7.2. Administración de bolos a los animales

Se utilizaron 2 bolos por animal para el grupo correspondiente, se administraron de manera manual a través de la cavidad oral hasta observar la deglución de este.

5.8. Selenio parenteral

Al grupo Se parenteral se les aplicó una formulación inyectable de Se más vitamina E, *Beef-Se*[™] elaborada por laboratorios Aranda Reg. SAGARPA Q-0449-015. Cada mililitro contiene 10.96 miligramos de selenito de sodio equivalente a 5 miligramos de Se, más 60 miligramos de vitamina E acetato y vehículo cuanto baste para un mililitro.

Para calcular la dosis de Se que se le administraría a cada animal, se utilizó la siguiente formula:

$$A = (B \times C)/D$$

Donde:

A = Cantidad de mililitros a aplicar.

B = Peso vivo de la cabra.

C = Dosis sugerida en miligramos por cada kilogramo de peso vivo.

D = Concentración de Se elemental en miligramos por cada mililitro del producto comercial.

Para la administración parenteral se consideró una dosis sugerida de 0.25 miligramos de Se por kilogramo de peso vivo. La fórmula se administró de manera subcutánea y se realizaron dos administraciones a lo largo del experimento.

Tabla 6. Cantidad de formulación aplicada a los animales durante el experimento

Animal	Grupo de estudio	Primera administración en mililitros 06-10-15	Segunda administración en mililitros 31-10-15
14	Grupo Selenio Parenteral	1.315	1.53
15		1.016	1.23
16		0.636	0.76
17		1.347	1.58
18		1.349	1.15
19		1.343	1.5
20		0.956	1.15

5.9. Estimulación de la respuesta inmunitaria de los animales de estudio

Se utilizó una bacterina-toxoide elaborada en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) para estimular la respuesta inmunitaria en los animales utilizados para este estudio *Toxo Bac Neumonías*, elaborado a base de bacterias inactivadas y un sobrenadante rico en un leucotoxoide y otros antígenos solubles obtenidos a base de crecimiento rápido de *Mannhemia haemolytica*, cada frasco contiene 50 ml. Fórmula: Contiene una suspensión de bacterina de 1×10^6 Unidades Formadores de Colonias por mililitro (UFC/ml) de *Pasteurella multocida* tipo A, *Mannhemia haemolytica* serotipo A1 y A2 enriquecida con leucotoxoide de *Mannhemia haemolytica*. A todos los animales involucrados en el estudio se les administraron dos dosis de 2.5 ml por animal de forma subcutánea con intervalos de 15 días entre cada administración.

5.10. Muestras de sangre

Se tomaron muestras de sangre por venopunción de la vena yugular externa; se utilizaron agujas y tubos vacutainer (sistema al vacío) Vacutainer® calibre 20G-X 38mm y tubos con vacío con Heparina, con EDTA y para obtención de suero Vacutainer® BD. Las muestras se tomaron previo a la administración de los tratamientos y semanalmente después de la administración de los mismos.

Las muestras obtenidas se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min para separar plasma o suero según la muestra para hacer las pruebas de estimación de niveles de Se, biomarcadores de estrés oxidativo y respuesta inmunitaria.

5.11. Estimación de las concentraciones de selenio en eritrocitos

Para la cuantificación de Se total en eritrocitos se realizó en base al procedimiento reportado por Cleason, 2004. Se utilizó la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros después de una digestión ácida en horno de microondas, en el Laboratorio de Métodos de Desarrollo Analítico de la FESC-UNAM, México. Se colocaron aproximadamente 0.5 g de la muestra, 5 mL de H₂O desmineralizada (Millipore, Billerica, USA), 2.5 mL de HNO₃ y 1 ml de H₂O₂ (J.T. Baker, México City, México) en contenedores de teflón por 10 min y se digirieron usando un horno microondas (MAR 5, CEM, Falcon, USA). Los contenedores fueron enfriados a temperatura ambiente, el contenido fue vaciado en matraces volumétricos de 25 mL (cada contenedor fue lavado tres veces con HCL 7M), fueron aforados a la marca con HCL 7M. Las muestras se vaciaron en contenedores de polietileno marcados y la cuantificación total de Se se determinó a través de una curva de calibración de 5-25 mg Se/l (Se estándar, High-Purity, 1000 ± 3µg/ml in 2% de ácido nítrico. 99.99 de pureza, Scientific Company Selenium Powder) (Ghany-Hefnawy et al., 2007).

5.12. Estimación de GSH

Se desarrolló e implementó una técnica para evaluar el contenido de GSH en eritrocito de cabra utilizando el reactivo de Ellman (Peter, E. *et al.*, 1985; Peter, E. *et al.*, 2003). Las muestras recolectadas de los animales de estudio fueron homogenizadas en PBS conteniendo inhibidores de proteasas (buffer de lisis) para evitar la degradación de la muestra. Posteriormente, se les adicionó ácido sulfosalicílico 5% en relación 1:1 (vol/vol) y fueron incubadas en hielo por 20 min para precipitar las proteínas; al término del tiempo de incubación las muestras fueron sometidas a centrifugación por 5 min a 12,000 rpm a 4°C. Se tomaron 50 µL del sobrenadante, los cuales se pusieron en contacto con 150 µl del buffer de reacción (pH 7) DTNB [ácido 5´5´-dithio-bis(2-nitrobenzoico)] y EDTA, esta muestra se incubó a 37°C por 10 minutos en un baño María. Después de la incubación, las muestras fueron leídas en espectrofotómetro a 412 nm. La concentración de GSH de las muestras se determinó usando un gráfico estándar generada con concentraciones conocidas de GSH. El grupo sulfhidrilo de GSH reacciona con el DTNB y genera un producto coloreado amarillo 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB)(Eyer and Podhradský, 1986).

5.13. Estimación de MDA

La estimación de la cantidad de MDA en plasma se estimó a través de la técnica de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) para medir la lipoperoxidación (Janero, 1990; Lykkesfeldt, 2001).

En la medición de MDA a través de la prueba de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), se estima el daño a tejidos y células mediante la determinación de los principales productos de la lipoperoxidación, el método mide los productos de descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, tales como el malondialdehído y otros aldehídos que son capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (Koningsberg, 2008). Se adaptó la técnica de cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (Zuñiga, 2008) para muestras de plasma de cabra.

Las muestras recolectadas también fueron homogenizadas en PBS conteniendo inhibidores de proteasas (buffer de lisis) para evitar la degradación de las mismas. Posteriormente se adicionó ácido perclórico 2.5% en relación 1:1 (vol/vol) para precipitar las proteínas, posteriormente se incubaron en hielo por 20 min; al termino del tiempo de incubación las muestras fueron sometidas a centrifugación por 5 min a 12,000 rpm a 4°C. Se tomaron 100 µL del sobrenadante los cuales se pusieron en contacto con 100 µL de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67%, posteriormente la muestra se incubó a 90°C por 30 minutos en un baño seco. Después, las muestras fueron leídas en espectrofotómetro a 540 nm.

El principio de la prueba se basa en un reactivo cromogénico, en la cual el ácido 2-tiobarbiturico, reaccionará con el MDA el cual es un producto de la lipoperoxidación celular. Una molécula de MDA reaccionará con dos moléculas de ácido 2-tiobarbiturico vía condensación a temperatura de 90° C, para dar paso a un cromóforo. El contenido de MDA de las muestras se cuantificó usando una curva estándar generada con concentraciones conocidas del lipoperóxido. Para cuantificar las proteínas totales en cada muestra se utilizó el método Bradford, utilizando Protein Assay Bio-Rad® siguiendo las indicaciones del proveedor.

5.14. Estimación de la actividad de Catalasa

La actividad de la catalasa se realizó en el paquete eritrocitario, esta estimación fue hecha a través de una técnica visual simple. Este ensayo utiliza reactivos simples y fáciles de conseguir, como el peróxido de hidrógeno, Triton X-100 y catalasa.

Las muestras a utilizar se colocaron dentro de tubos de ensayo de 7 x 75 mm (Pyrex No. 9820). Antes de comenzar la prueba los tubos se colocaron dentro de una estufa a 37°C por 15 minutos.

Para la muestra de eritrocitos primero se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, para lo cual se calcularon los μL de la muestra equivalentes a 500 μg de proteína. Una vez calculados los μL de la muestra, se agregan los μL de PBS necesarios para tener un volumen final de 200 μL . Se tomaron 100 μL de esta dilución de la muestra a medir y se colocaron en los tubos de ensayo, posteriormente se adicionaron 100 μL de una solución de Tritón x-100 al 1%, se agitó suavemente y se incubaron por 15 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 100 μL de H_2O_2 al 30% y se volvieron a incubar a 37°C por 3 minutos.

Para determinar la actividad de la catalasa los tubos se colocaron junto a una regla para medir la altura de la espuma desde la base del tubo. Se debe de considerar que esta espuma es estable entre 3 y 5 minutos.

El principio de esta prueba es que las burbujas de oxígeno que se generan por la descomposición del peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima catalasa son atrapadas por el surfactante Triton X-100. Las burbujas atrapadas pueden ser visualizadas como espuma y esta puede ser medida a través de la altura del tubo de ensayo. No se utilizó ningún reactivo para detener la reacción, ya que la generación de oxígeno se detiene de forma natural a los 5 min (Iwase et al., 2013).

5.15. Estimación de la concentración de inmunoglobulina G en los grupos de estudio a través de la prueba de ELISA

Esta prueba se realizó en microplacas de polietileno de 96 pozos de fondo plano se agregaron 100 μL del antígeno (*Mannheimia haemolytica* elaborado en el INIFAP) en cada pozo incubando durante 24 horas a 37° C. Pasado este tiempo se realizó un ciclo de tres lavados con PBS Tween-20 mediante un lavador de microplacas. Se agregó una solución de leche descremada al 2% en PBS, con la finalidad de ocupar sitios en donde no hubo adsorción del antígeno, dejándola por 60 minutos a 37° C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20. Por

último, se cubrieron las placas con papel aluminio y se almacenaron a 4° C hasta su uso.

Posteriormente se depositaron 100 µl de suero problema en cada pozo a una dilución de 1:20 en PBS, incubando a 37° C en una estufa bacteriológica por espacio de 60 minutos, pasado este tiempo se realizaron tres lavados con PBS Tween-20. Se agregaron 100 µL de conjugado *Rabbit anti-sheep* IgG en cada pozo a una dilución de 1:2000 en PBS, incubando 60 minutos a 37° C, se realizaron tres lavados con PBS Tween-20 y se adicionaron 100 µL de sustrato (ABTS de Sigma Chemicals Co). Se realizó la lectura en un espectrofotómetro múltiple calibrado a 405 nm (EIA multi-well reader de Sigma D)

5.16. Hemoaglutinación indirecta para la determinación de anticuerpos contra antígenos capsulares de *Manhemia haemolytica*

Se tomaron muestras de sangre periférica de ovinos con tubos con heparina como anticoagulante, posteriormente se centrifugaron a 800 xg por 5 minutos, se decantó el sobrenadante, el paquete celular se re-suspendió en solución salina balanceada (SSB) 1x y se repitió el mismo procedimiento de centrifugación y resuspensión en dos ocasiones más para eliminar los elementos plasmáticos (Morales-Alvarez et al., 1993).

Se elaboró el antígeno cultivando a *Manhemia haemolytica* serotipo A1 y A2 en 300 mL de medio caldo infusión cerebro corazón (BHI) durante 18 horas a 37° C, en estufa bacteriológica con movimiento constante. Posteriormente se inactivó a 56° C por 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron los eritrocitos de ovino a una concentración de 1%, se incubó de nueva cuenta en estufa bacteriológica durante una hora a 37° C. Concluido el tiempo de sensibilización, la muestra se centrifugó a 800 xg durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó con SSB 1x por tres ocasiones, el paquete celular se resuspendió en SSB 1X. Para conservar se agregó formol a una concentración final de 0.3%. Una vez realizado esto, en placas de microtitulación de 96 pozos en forma de "U" se

agregaron 25 μL de SSB 1x en todos los pozos; en el primer pozo de cada fila se agregó 25 μL de suero problema. Se hicieron diluciones dobles de los sueros hasta la fila "H". Posteriormente se agregaron 25 μL de eritrocitos sensibilizados con *Manhemia haemolytica* del serotipo A1 y A2. Se dejó reposar durante dos horas y se realizó la lectura (Morales-Alvarez et al., 1993).

Un fondo con un punto rojo en el centro del pozo indica que no hay presencia de anticuerpos anticápsula en el suero. Un fondo con una corona en el centro del pozo, indica aglutinación de los eritrocitos sensibilizados y por lo tanto presencia de anticuerpos anticápsula con capacidad hemoaglutinante del suero. Los título de anticuerpos fueron transformados a logaritmo base 2 (\log_2) para su mejor evaluación.

5.17. Diseño experimental

Los tratamientos fueron asignados mediante un diseño de un factor (tratamiento) completamente al azar con tres niveles (GC, GB y GP). Las variables de respuesta fueron Se, GSH, CAT, concentración de MDA e IgG contra *Mannheimia haemolytica* y título de anticuerpos para la hemoaglutinación indirecta. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey utilizando una diferencia estadística significativa al 0.05. El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

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

Donde: Y_{ijk} = j-esima observación de la variable de respuesta tomada bajo el i-esimo tratamiento a tiempo k, μ = media general, τ_i = efecto del i-esimo tratamiento, α_k = efecto del k-esimo tiempo, β_{ij} = efecto aleatorio al j-esimo animal en el tratamiento i, $(\tau\alpha)_{ik}$ = efecto de la interacción del i-esimo tratamiento por el k-esimo tiempo, ϵ_{ijk} = error aleatorio asociado con el j-esimo animal en el tratamiento i a tiempo k.

Variables de respuesta a medir:

- a. Concentraciones de Se en eritrocitos.
- b. Glutación (GSH) en plasma y eritrocitos.
- c. TBARS en plasma.
- d. IgG en suero: por el método de ELISA.
- e. Hemoaglutinación
- f. Consumo de alimento.
- g. Ganancia de peso

6. Resultados

6.1. Evaluación de las características físicas de los bolos intrarruminales de selenio

Se hicieron mediciones a los bolos para conocer el peso, densidad, dureza, largo y ancho de los bolos. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Mediciones hechas a bolos intrarruminales

Numero de observación	Peso g (gramos)	Densidad (g/mL)	Dureza kp (kilopunds)	Largo mm (milímetros)	Ancho mm (milímetros)
1	7.933	2.644	22.80	18.990	15.000
2	8.007	2.670	28.80	18.890	15.010
3	8.022	2.674	25.70	19.170	15.010
4	8.068	2.689	25.70	18.990	15.010
5	7.983	2.661	24.40	19.000	15.010
6	7.952	2.651	22.70	19.140	15.020
Promedio	7.994	2.665	25.017	19.030	15.010
Error estándar	0.020	0.007	0.929	0.043	0.003

Se observa en la tabla 7 que el peso promedio de los bolos es de 7.994 g, con un error estándar de 0.020 g; la densidad promedio es de 2.665 g/mL, con un error estándar de 0.007 g/mL; la dureza promedio es de 25.017 Kp con un error estándar de 0.929 kp. Las medidas de largo y ancho son de 19.030 mm y 15.010 mm respectivamente, con un error estándar de 0.043 mm y 0.003 mm

respectivamente. Considerando las mediciones obtenidas se administraron al grupo correspondiente por vía oral.

6.2. Evaluación del peso en los animales de estudio

Se tomó el peso de los animales, se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia para esta variable, considerando un valor $P < 0.05$, la cual se puede observar en la tabla 8, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 9. Se realizó una gráfica para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales para la evaluación de peso en la Figura 2; con el peso promedio de los animales se graficó por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 3. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 4.

Tabla 8. Análisis de varianza para peso de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	381.257	3	127.086	5.25	0.0024
Residuo	1864.34	77	24.2123		
Total (Corr.)	2245.6	80			

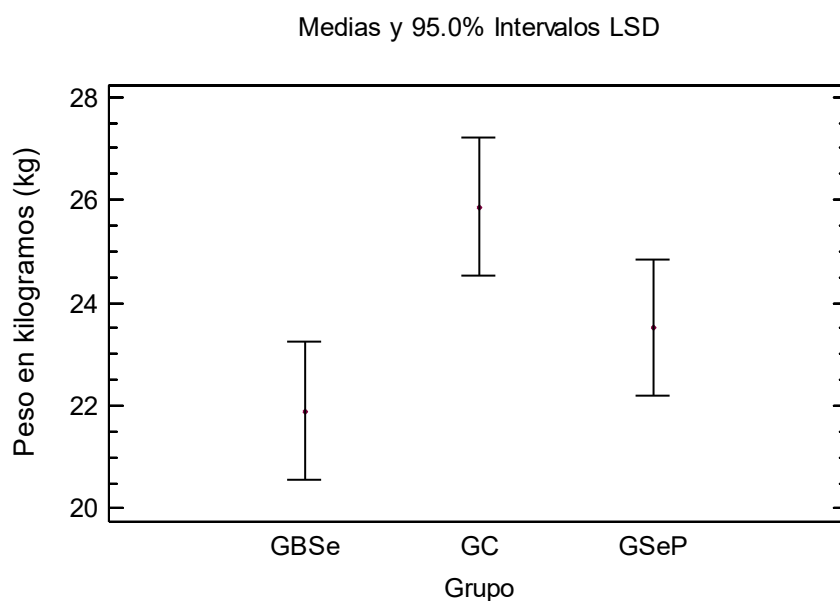
En la tabla 8 se observa el análisis de varianza realizado para la variable peso de los grupos de estudio. Se observa que, dado que el valor-P en la tabla ANOVA para peso es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre el peso y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 9. Suma de cuadrados tipo III para peso de los animales de estudio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Grupo	214.012	2	107.006	4.42	0.0152
Día de Estudio	167.245	1	167.245	6.91	0.0104
Residuo	1864.34	77	24.2123		
Total (corregido)	2245.6	80			

En la tabla 9 se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para la evaluación de la variable peso en el experimento para observar los niveles de significancia del grupo y del día de estudio. La tabla 9 para Peso prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo estadístico. Nótese que el valor-P más alto es 0.0152, que corresponde al Grupo. Dado que el valor-P es menor que 0.05, ese término es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. De la misma forma se observa que el valor-P de 0.0104 correspondiente al Día de Estudio es menor que 0.05, siendo de la misma forma significativo con un nivel de confianza de 95.0%.

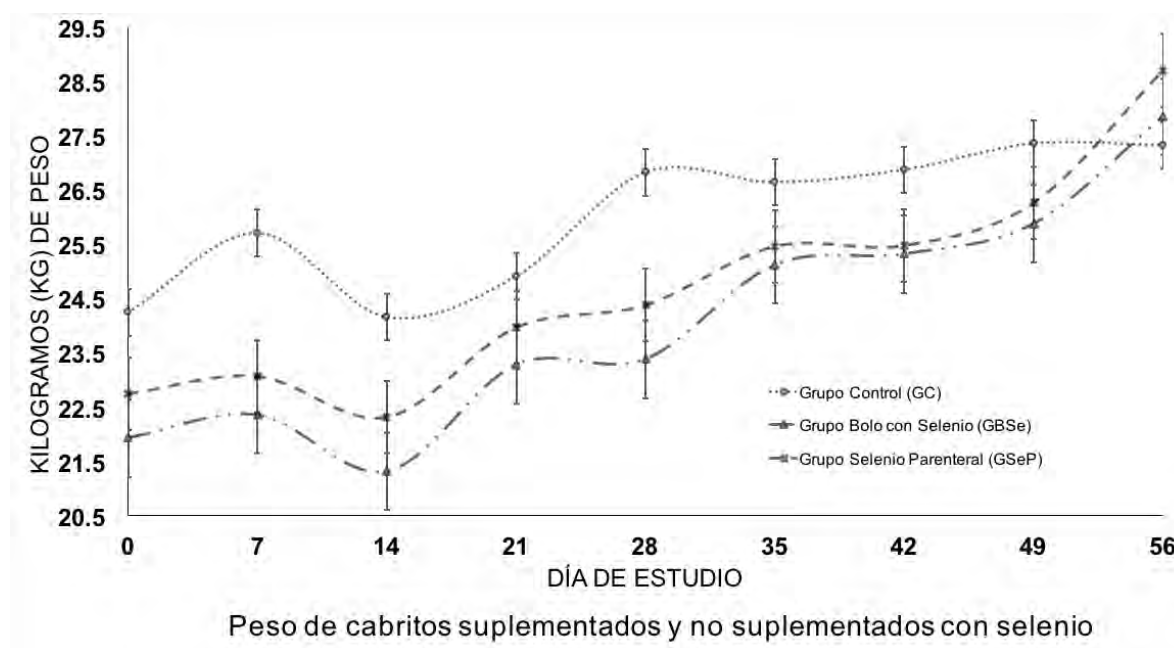
Figura 2. Medias de peso por grupo de estudio dentro del experimento



En la Figura 2 se observa las medias y sus errores estándar dentro del experimento para evaluar el peso de los grupos de estudio dentro del experimento.

Se observa que GC tiene una media de peso significativamente mayor que GBSe $P < 0.05$, pero no que GSeP, este último sin diferencia significativa con los demás grupos en el estudio $P > 0.05$.

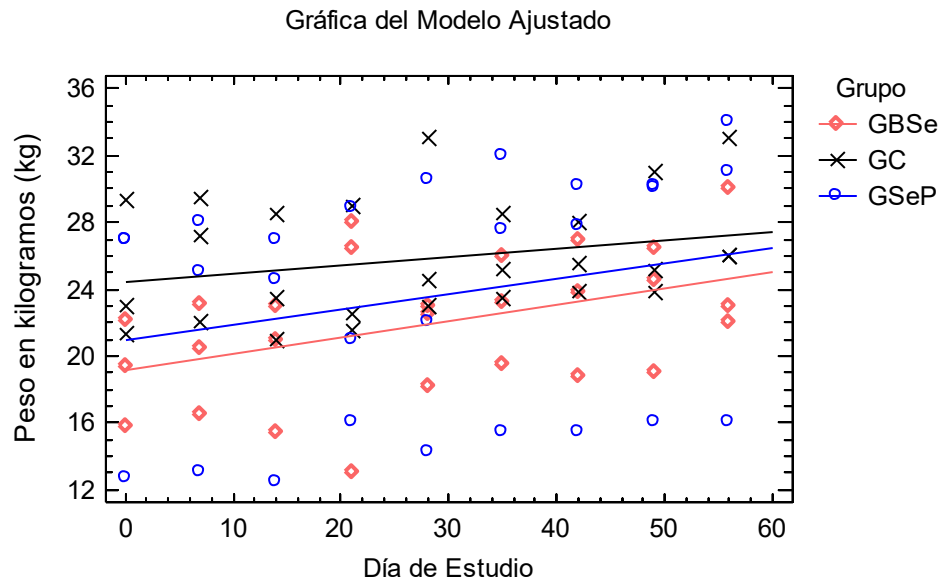
Figura 3. Peso promedio por día de los animales por grupo de estudio



En la Figura 3 describe el peso promedio de los grupos de estudio a través del tiempo, se observa que al comienzo del estudio en el día 0 GC empieza con un peso promedio significativamente diferente ($P < 0.05$) a los grupos suplementados con Se en promedio (24.250 vs 22.341 kg) sin diferencia estadística significativa entre los suplementados ($P > 0.05$). Del día 7 al día 14 continúa habiendo una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre GC y los grupos suplementados para el día 21 se observa que no hay diferencia estadística significativa en peso promedio de los grupos de estudio (24.058 kg), para el día 28 se observa de nueva cuenta una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el GC y los grupos suplementados (26.833 kg vs 23.885 kg) sin diferencia estadística significativa entre estos últimos ($P > 0.05$). En el día 49 no se observa diferencia estadística significativa entre los grupos ($P > 0.05$) con un peso promedio de 26.507 kg. Para el día 56 los grupos suplementados tienen

un mayor peso promedio que GC aunque sin diferencia estadística significativa entre grupos ($P>0.05$) con un peso promedio de los grupos de 27.968 kg.

Figura 4. Peso de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 4 se muestra el gráfico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en la evaluación del peso de estos. Durante todo el estudio GC se mantuvo con el mayor peso dentro del experimento a diferencia de GBSe y GSeP. También se puede apreciar la dispersión de datos debido a los animales dentro de los grupos.

6.3. Ganancia de peso en los grupos de estudio

Con el peso de los animales de los grupos de estudio se realizó un análisis para saber la ganancia de peso por grupo de estudio dentro del experimento. Se hizo un análisis de varianza para observar si hubo significancia para la ganancia de peso, considerando un valor $P<0.05$, el cual se puede observar en la tabla 10, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 11. Se realizó una

gráfica para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales para la ganancia de peso, la cual se puede observar en la Figura 5; la ganancia de peso se graficó por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 6. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 7.

Tabla 10. Análisis de varianza para ganancia de peso de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	26.9942	3	8.99807	9.67	0.0000
Residuo	71.6719	77	0.930803		
Total (Corr.)	98.6661	80			

La tabla 10 resume los resultados de ajustar un modelo estadístico lineal general que relaciona a ganancia de peso con 3 factores predictivos. Dado que el valor-P en la tabla ANOVA para Ganancia de peso es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre Ganancia de peso y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

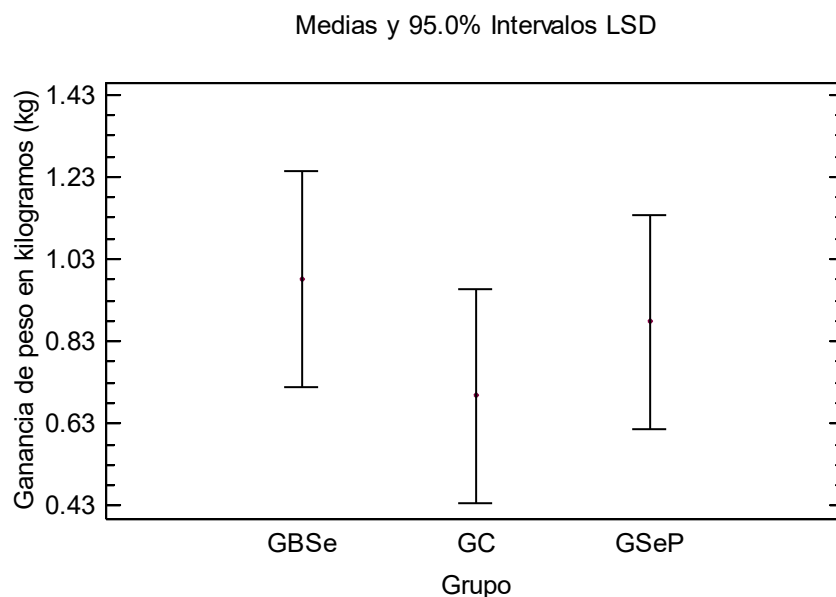
Tabla 11. Suma de cuadrados tipo III para ganancia de peso de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	1.11278	2	0.55639	0.60	0.5526
Día de Estudio	25.8814	1	25.8814	27.81	0.0000
Residuo	71.6719	77	0.930803		
Total (corregido)	98.6661	80			

La tabla 11 con respecto a la suma de cuadrados para Ganancia de peso prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Se observa que el valor-P más alto es 0.5526, que corresponde al Grupo. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente

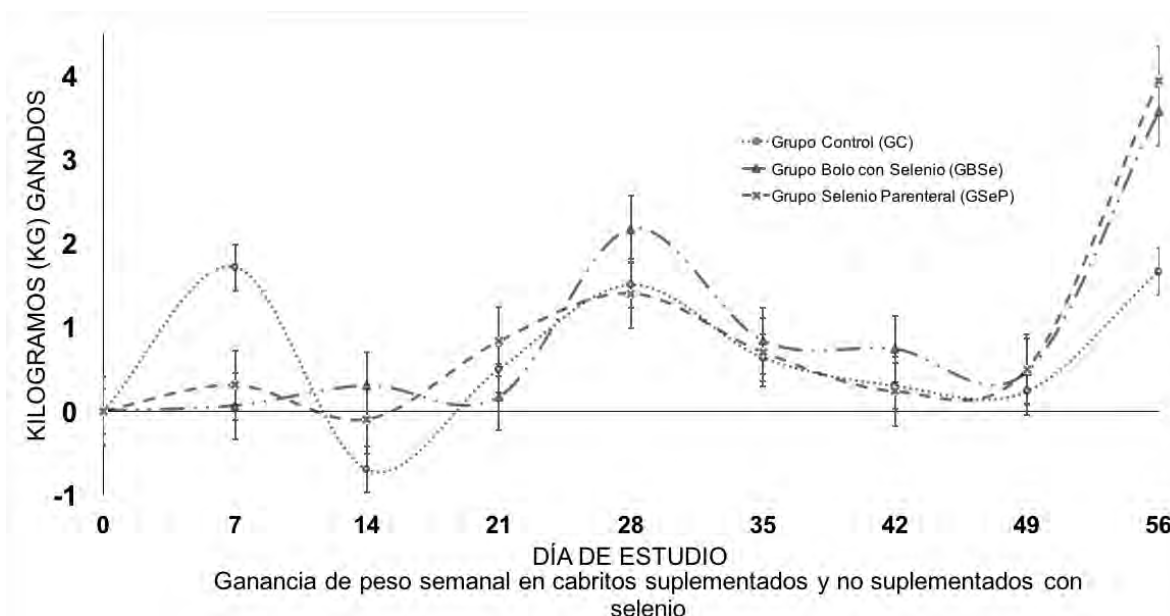
significativo con un nivel de confianza del 95.0%. Sin embargo, el valor del día de estudio es menor a 0.05, por lo que resulta estadísticamente significativo con un nivel de confianza de 95.0%.

Figura 5. Medias sobre la ganancia de peso por grupo de estudio dentro del experimento



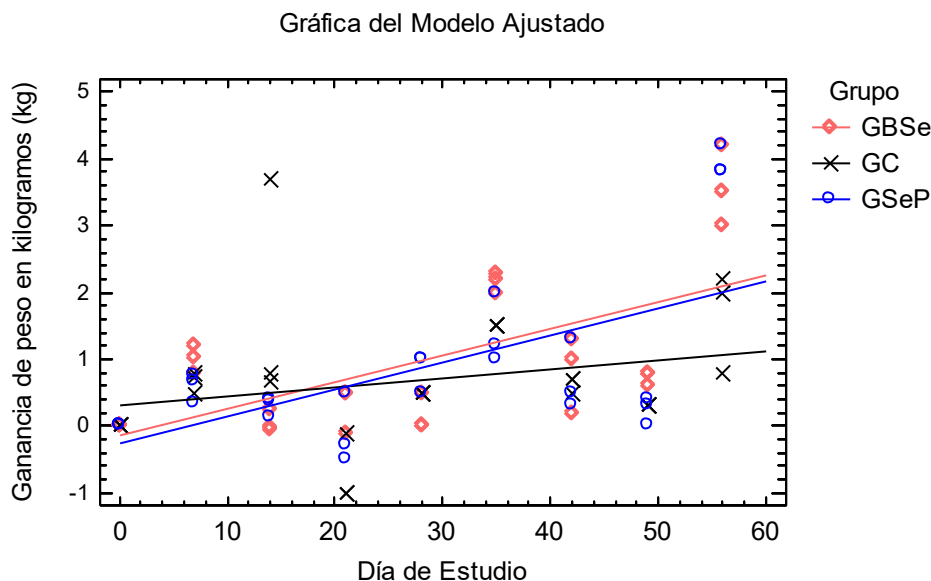
En la Figura 5 se observa las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento para evaluar diferencias en la ganancia de peso. En esta Figura se observa que no hay diferencia significativa $P > 0.05$ entre los grupos de estudio en todo el experimento.

Figura 6. Ganancia de peso promedio por día de los animales por grupo de estudio



La Figura 6 describe la ganancia de peso de los grupos de estudio a través del tiempo. En el día 0 se observa que no hay diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio ($P > 0.05$). Para el día 7 se observa que hay una diferencia estadística ($P < 0.05$) entre GC y los grupos suplementados con Se en promedio (1.713 kg vs 0.367 kg). Para el día 14 GBSe tiene mayor ganancia de peso y el GC pierde peso con números negativos (0.300 kg y -0.700 kg respectivamente) sin diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio ($P > 0.05$). En los siguientes días no se observa diferencia entre grupos en la ganancia de peso. Sin embargo, para el día 56 se observa que los grupos suplementados con Se tienen mayor ganancia de peso en promedio con una diferencia significativa ($P < 0.05$) con GC (3.75 kg vs 1.667 kg).

Figura 7. Ganancia de peso de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 7 se muestra el gráfico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere a la ganancia de peso. Se observa que los grupos suplementados con Se (GBSe y GSeP) tienen una mayor ganancia de peso durante el experimento que GC. Se puede apreciar que la dispersión de datos dentro de cada uno de los grupos de estudio.

6.4. Consumo de alimento

En el experimento se tomó en cuenta el consumo de alimento de los animales dentro de los grupos de estudio. Se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia estadística para el consumo de alimento, considerando un valor $P < 0.05$, el cual se puede observar en la tabla 12, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 13. Se realizó una gráfica para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales para el consumo de alimento, la cual se puede observar en la Figura 8; el consumo de alimento se graficó por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 9. Por

último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 10.

Tabla 12. Análisis de varianza para consumo de alimento de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	9.20479	3	3.06826	1.53	0.2122
Residuo	153.935	77	1.99916		
Total (Corr.)	163.14	80			

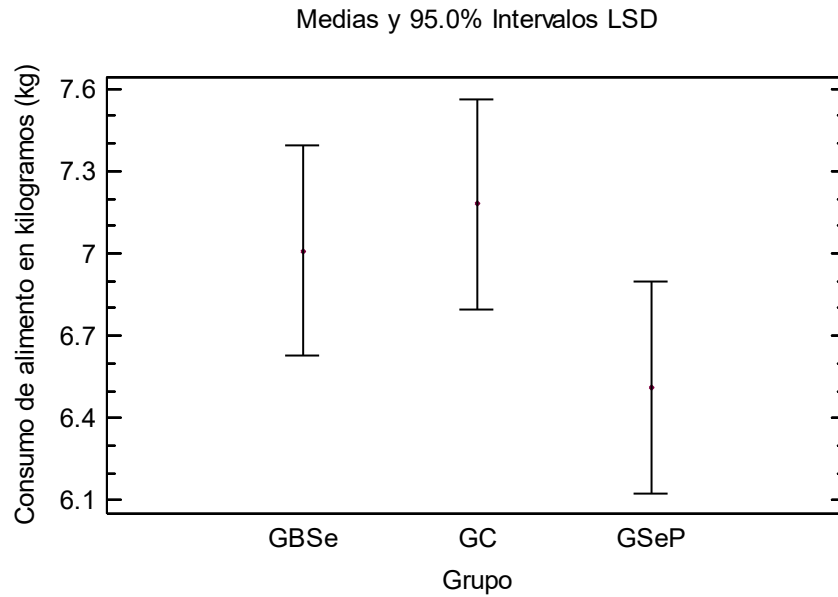
En la tabla 12 se resume los resultados de ajustar un modelo estadístico lineal general que relaciona a consumo de alimento con 3 factores predictivos. Dado que el valor-P en la tabla ANOVA para consumo de alimento es mayor o igual que 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre consumo de alimento y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 13. Suma de cuadrados tipo III para consumo de alimento de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	6.50815	2	3.25408	1.63	0.2031
Día de Estudio	2.69664	1	2.69664	1.35	0.2491
Residuo	153.935	77	1.99916		
Total (corregido)	163.14	80			

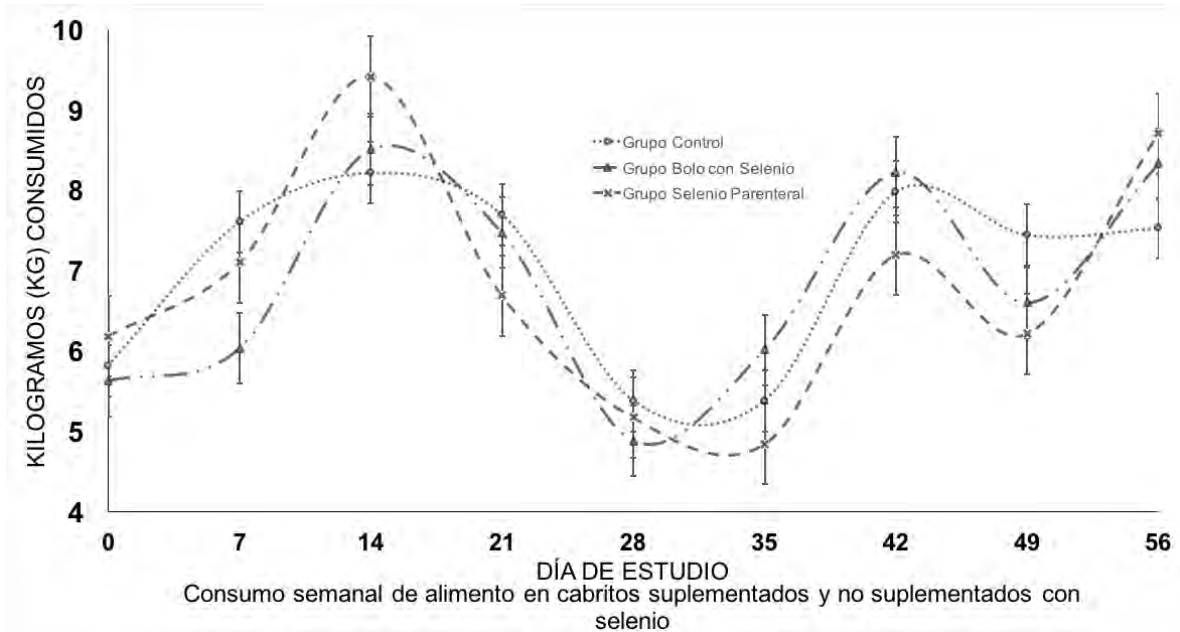
La tabla 12 para consumo de alimento prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.2491, que corresponde a Día de Estudio. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. De la misma forma el valor-P 0.2031 correspondiente al Grupo tampoco es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 8. Medias sobre consumo de alimento por grupo de estudio dentro del experimento



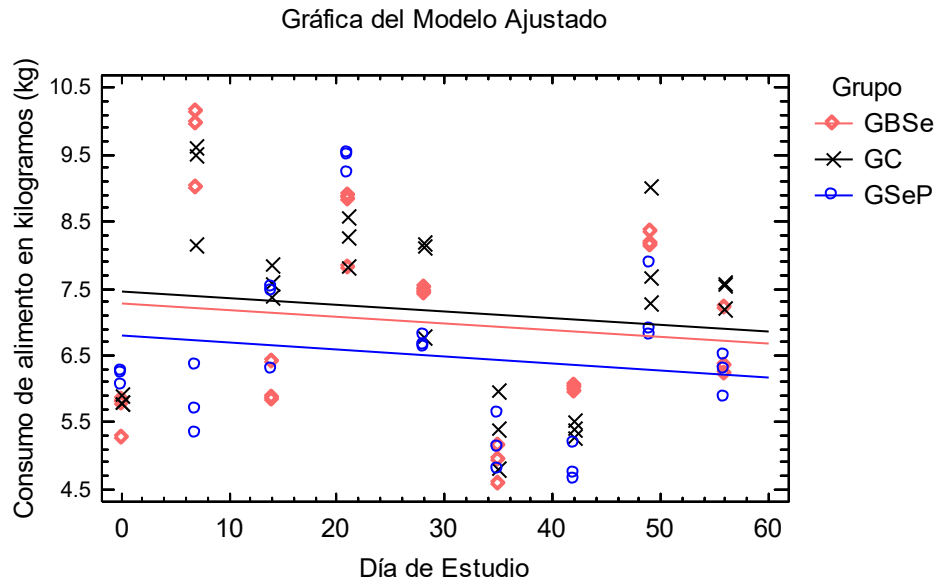
En la Figura 8 se observa las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento para evaluar diferencias sobre el consumo de alimento. En esta Figura se observa que no hay diferencia significativa $P > 0.05$ entre los grupos de estudio en todo el experimento.

Figura 9. Consumo de alimento promedio por día de los animales por grupo de estudio



La Figura 9 se refiere al consumo de alimento a través de los días de estudio; se observó que en el día 0 no hay diferencias significativas entre grupos ($P > 0.05$) promediando un consumo para todos los grupos en este día de 5.88 kg. En el día 7 GC y GSeP aumentan su consumo de alimento sin diferencias significativas entre estos dos grupos ($P > 0.05$) sin embargo, si hay una diferencia entre estos dos grupos y GBSe, el cual tiene un menor consumo de alimento (6.82 kg vs 7.10 kg). A partir de este día y hasta el final del experimento no se observan diferencias significativas entre grupos para el consumo de alimento, promediando un consumo de alimento para los días 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 46 de 8.71 kg, 7.29 kg, 5.15 kg, 5.41 kg, 7.80 kg, 6.75 kg y 8.19 kg respectivamente.

Figura 10. Consumo de alimento de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 10 se muestra el grafico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere al consumo de alimento. Se observa que los tres grupos mantienen una tendencia lineal durante todo el experimento. Además, se puede observar que GSeP consumió menor alimento y que GC fue el grupo que más alimento consumió dentro de todo el experimento.

6.5. Evaluación de la concentración de selenio en eritrocitos en los animales de los grupos de estudio

Se evaluó la concentración de Se en el experimento. Se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia estadística para el consumo de alimento, considerando un valor $P < 0.05$, el cual se puede observar en la tabla 14, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 15. Se realizó una gráfica para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales para las concentraciones de Se, la cual se puede observar en la Figura 11; las concentraciones de Se se graficaron por grupo y por día de estudio para observar

diferencias para esta variable en la Figura 12. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 13.

Tabla 14. Análisis de varianza para concentración de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	51987.2	3	17329.1	8.40	0.0001
Residuo	158815.	77	2062.53		
Total (Corr.)	210802.	80			

En la tabla 14 se resumen los resultados de ajustar un modelo estadístico lineal general que relaciona a Se con 3 factores predictivos. Dado que el valor-P en la tabla ANOVA para Se es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre el Se y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

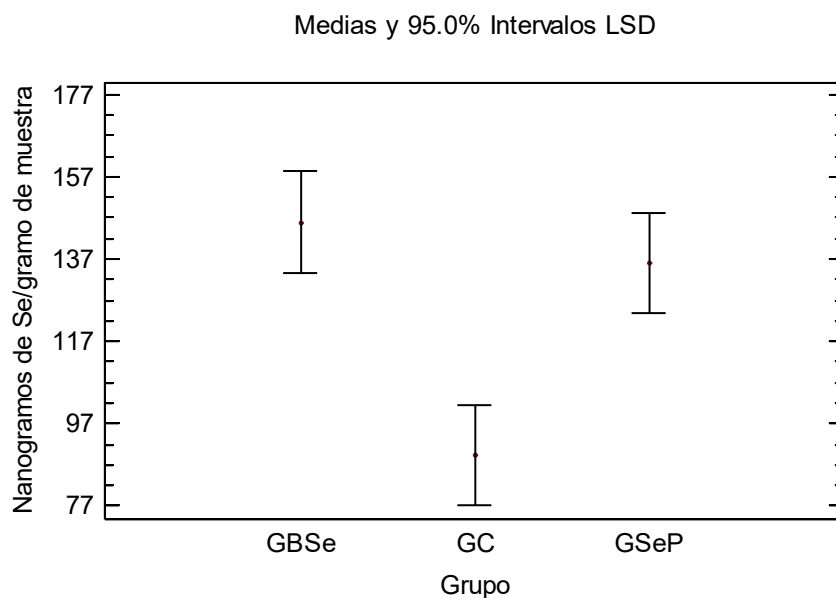
Tabla 15. Suma de cuadrados tipo III para concentración de Se en los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	49372.2	2	24686.1	11.97	0.0000
Día de Estudio	2615.02	1	2615.02	1.27	0.2637
Residuo	158815.	77	2062.53		
Total (corregido)	210802.	80			

La tabla 15 sobre el análisis para la suma de cuadrados tipo III para Se prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.2637, que corresponde al Día de Estudio. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. Sin embargo, el

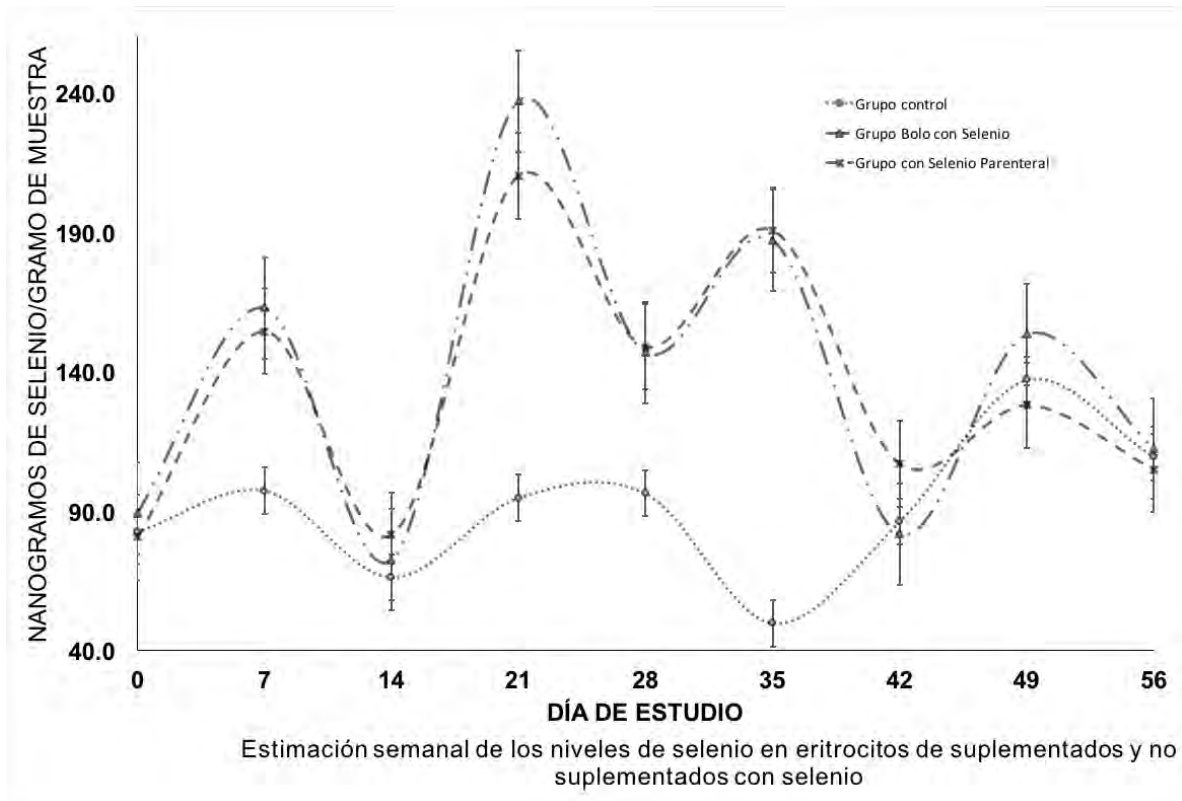
Grupo si tiene un valor-P de 0.0000 el cual es menor que 0.05, por lo que resulta estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 11. Medias de concentración de Se por grupo de estudio dentro del experimento



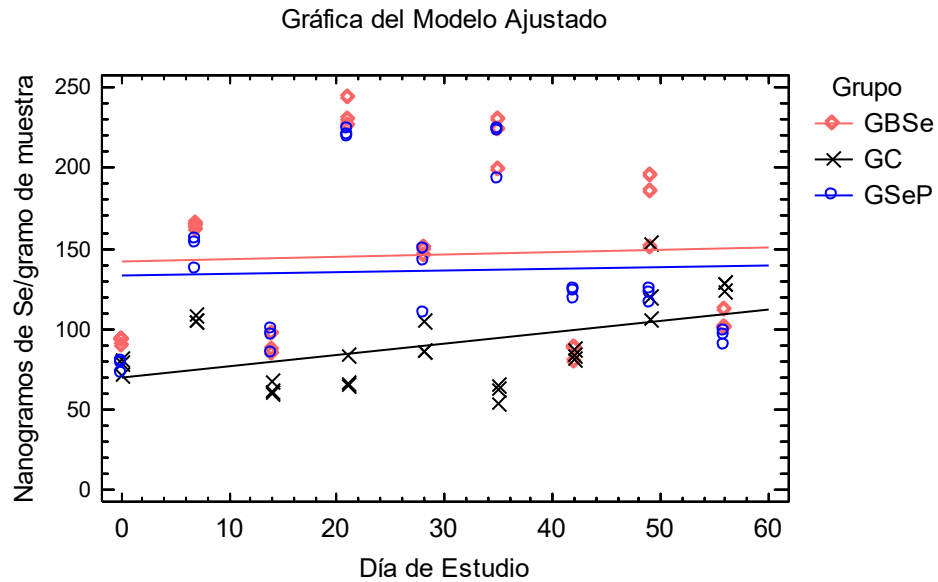
En la Figura 11 se observa las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento para evaluar diferencias sobre la concentración eritrocitaria de Se. En esta Figura se observa que GBSe Y GSeP tienen niveles significativamente más altos de Se en el experimento a diferencia de GC.

Figura 12. Concentración de selenio en eritrocitos en los grupos de estudio



En la estimación de la concentración de Se en los grupos de estudio se observa que para el día 0 no hay diferencia significativa entre grupos ($P > 0.05$) promediando 84.115 ng de Se por g de muestra. Para el día 7 los grupos suplementados tienen en promedio mayores niveles de Se sin diferencia significativa entre estos ($P > 0.05$), pero con una diferencia significativa con GC ($P < 0.05$) (158.617 ng vs 97.256 ng), en el día 14 de nueva cuenta no se observan diferencias en las concentraciones de Se en eritrocitos en los grupos de estudio con un promedio de 73.359 ng. En el día 21 se observa que los grupos suplementados tienen en promedio mayores concentraciones de Se sin diferencia significativa entre ellos ($P > 0.05$), pero significativamente diferentes a GC ($P < 0.05$) (223.668 ng vs 94.720 ng), lo mismo sucede para el día 28 (147.836 ng vs 96.310 ng) y en el día 35 (188.890 ng vs 49.707 ng). Del día 49 al 56 no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) entre grupos promediando 91.614 ng, 139.457 ng y 108.869 ng respectivamente.

Figura 13. Concentración eritrocitaria de Se en los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 13 se muestra el grafico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere a las concentraciones de Se. Se observa que GBSe y GSeP tienen mayores concentraciones de Se durante todo el experimento a diferencia de GC. Dentro de los grupos suplementados se observa que GBSe tiene mayores concentraciones a diferencia de GSeP, mientras que GC se mantiene por debajo todo el experimento.

6.6. Evaluación de la actividad de la Catalasa en eritrocitos de los animales en los grupos de estudio

Se midieron las actividades de Catalasa en los eritrocitos en los animales de los grupos experimentales. Se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia estadística para este parámetro, considerando un valor $P < 0.05$, el cual se puede observar en la tabla 16, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 17. También se realizó una gráfica para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales en lo que se refiere a las unidades de catalasa, la cual se puede observar en la Figura 14; la actividad de catalasa se graficó por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 15. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 16.

Tabla 16. Análisis de varianza para la actividad de catalasa en eritrocitos de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	6442.58	3	2147.53	8.85	0.0000
Residuo	18682.1	77	242.624		
Total (Corr.)	25124.6	80			

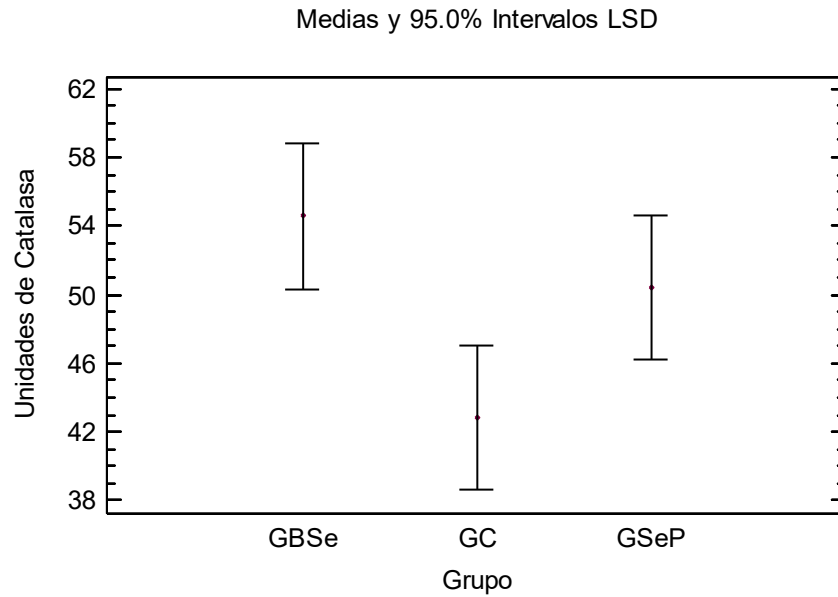
La tabla 16 en el análisis de actividad de catalasa de los grupos de estudio resume los resultados de ajustar 2 modelos estadísticos lineales generales para relacionar 2 variables dependientes con 3 factores predictivos. Dado que el valor-P en la tabla ANOVA para Unidades de Catalasa es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre actividad de Catalasa y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 17. Suma de cuadrados tipo III para la actividad de catalasa en eritrocitos de los grupos de estudio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Grupo	1905.38	2	952.69	3.93	0.0238
Día de Estudio	4537.2	1	4537.2	18.70	0.0000
Residuo	18682.1	77	242.624		
Total (corregido)	25124.6	80			

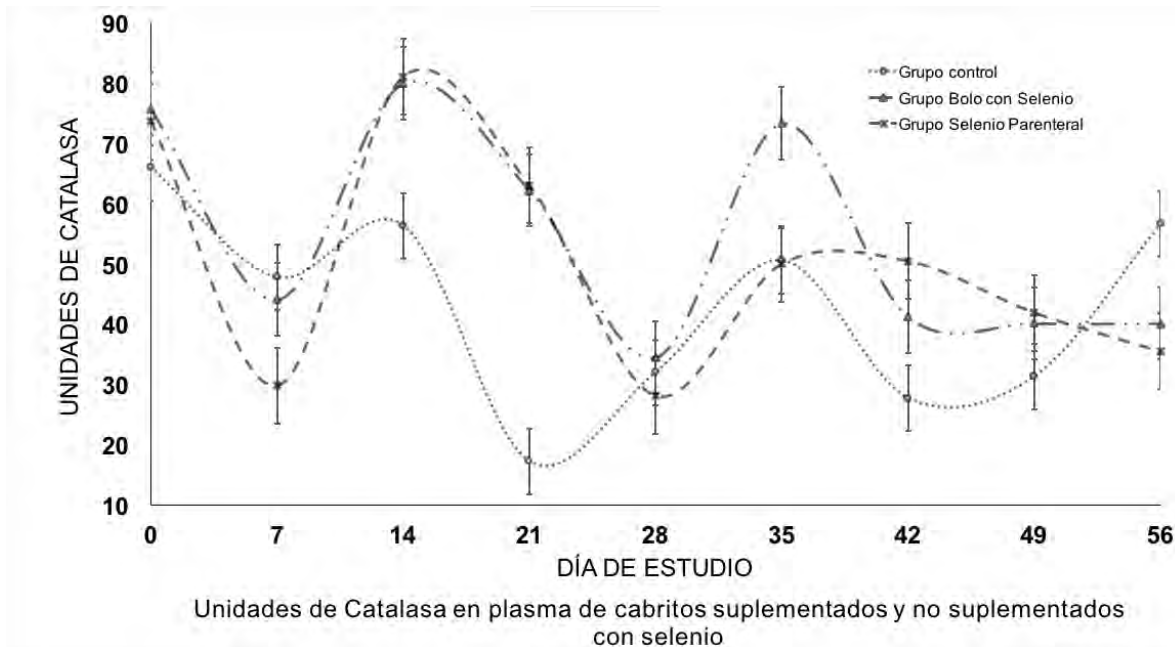
La tabla 17 muestra el análisis por suma de cuadrados para la actividad de Catalasa, la cual probó la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.0238, que corresponde al Grupo. Dado que el valor-P es menor que 0.05, ese término es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. De la misma forma el valor-P de 0.0000 correspondiente al Día de Estudio es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 14. Medias de catalasa en eritrocitos por grupo de estudio dentro del experimento



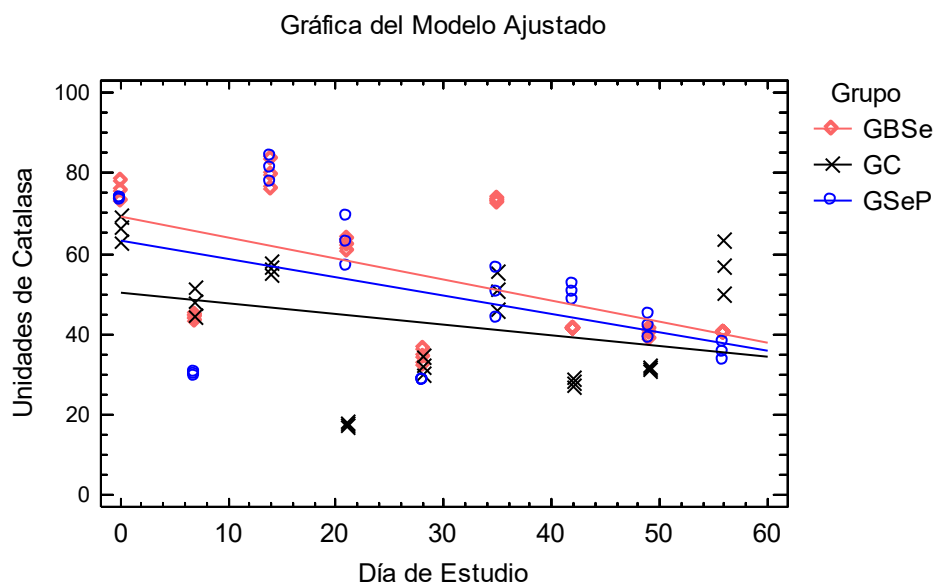
En la Figura 14 se observan las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento en la evaluación de catalasa en el experimento. Se observa que GBSe tiene valores significativamente más altos $P < 0.05$ que GC Y GSeP, estos dos sin diferencia estadística entre ellos $P > 0.05$.

Figura 15. Unidades de Catalasa en eritrocitos de los grupos de estudio



En la medición de la actividad catalasa en los grupos de estudio; en el día 0 no se observan diferencias significativas ($P>0.05$) entre grupos, promediando los tres para este día 71.786 unidades (U). Para el día 7 GC y GBSe presentan mayor actividad para catalasa en promedio, sin diferencia significativa entre ellos ($P>0.05$), pero si con diferencia con GSeP ($P<0.05$) (45.940 U vs 29.848 U). En el día 21 los grupos suplementados con Se presentan la mayor actividad para catalasa en promedio, sin diferencia significativa entre ellos ($P>0.05$), pero si con diferencias con el GC ($P<0.05$) (80.469 U vs 56.330 U), lo mismo se observa para el día 21 (62.598 U vs 17.219 U). En el día 28 no hay diferencia entre los grupos de estudio ($P>0.05$), promediando 31.564 U para este día. En el día 35 GBSe la catalasa tiene mayor actividad a diferencia de GSeP y GC, en promedio ($P<0.05$) (73.311 U vs 50.293 U). En el día 42 la catalasa presenta mayor actividad en los grupos suplementados con Se, sin diferencia significativa entre ellos ($P>0.05$), pero con diferencias con el GC ($P<0.05$) (45.830 U vs 27.719 U). En el día 49 no se observan diferencias significativas entre los grupos ($P>0.05$) promediando 37.805 U para este día. Por último, en el día 56 el GC tiene mayores U de catalasa ($P<0.05$) a diferencia de los grupos suplementados con Se en promedio (56.626 U vs 37.802 U).

Figura 16. Unidades de catalasa en eritrocitos de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 16 se muestra el gráfico realizado a través del análisis por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere a la actividad de la enzima catalasa en eritrocitos. Se observa que los tres grupos de estudio disminuyen la actividad de catalasa dentro de los eritrocitos a lo largo del experimento, siendo los grupos suplementados con Se los que tienen una mayor disminución y coincidentemente son los grupos que comienzan con mayor actividad de la enzima catalasa.

6.7. Evaluación de la concentración de MDA en plasma de los animales en los grupos de estudio

Se realizó la evaluación de la concentración de MDA en los animales de los grupos experimentales. Se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia estadística para este parámetro, considerando un valor $P < 0.05$, el cual se puede observar en la tabla 18, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 19. También se realizó una gráfica con medias y errores estándar para

observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales en lo que se refiere a la concentración plasmática de MDA, la cual se puede observar en la Figura 17; las unidades de catalasa se graficaron por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 18. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 19.

Tabla 18. Análisis de varianza para la concentración plasmática de MDA para los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00000113394	3	3.7798E-7	1.27	0.2891
Residuo	0.0000228383	77	2.96601E-7		
Total (Corr.)	0.0000239722	80			

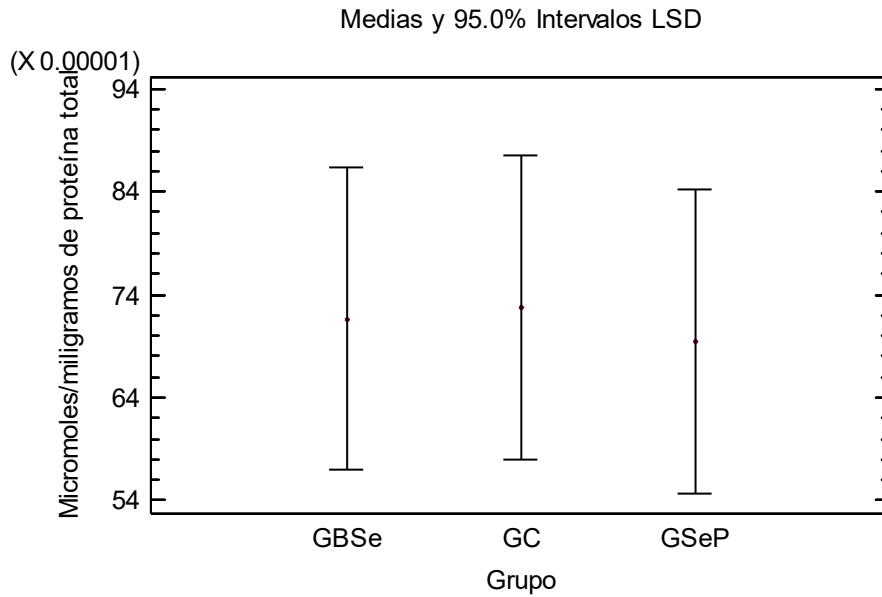
En la tabla 18 se resumen los resultados de ajustar 2 modelos estadísticos lineales generales para relacionar 2 variables dependientes con 3 factores predictivos. Dado que el valor-P en la primera tabla de resultados de la ANOVA para MDA es mayor o igual que 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre MDA y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 19. Suma de cuadrados III para la concentración plasmática de MDA para los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	1.60708E-8	2	8.03539E-9	0.03	0.9733
Día de Estudio	0.00000111787	1	0.00000111787	3.77	0.0559
Residuo	0.0000228383	77	2.96601E-7		
Total (corregido)	0.0000239722	80			

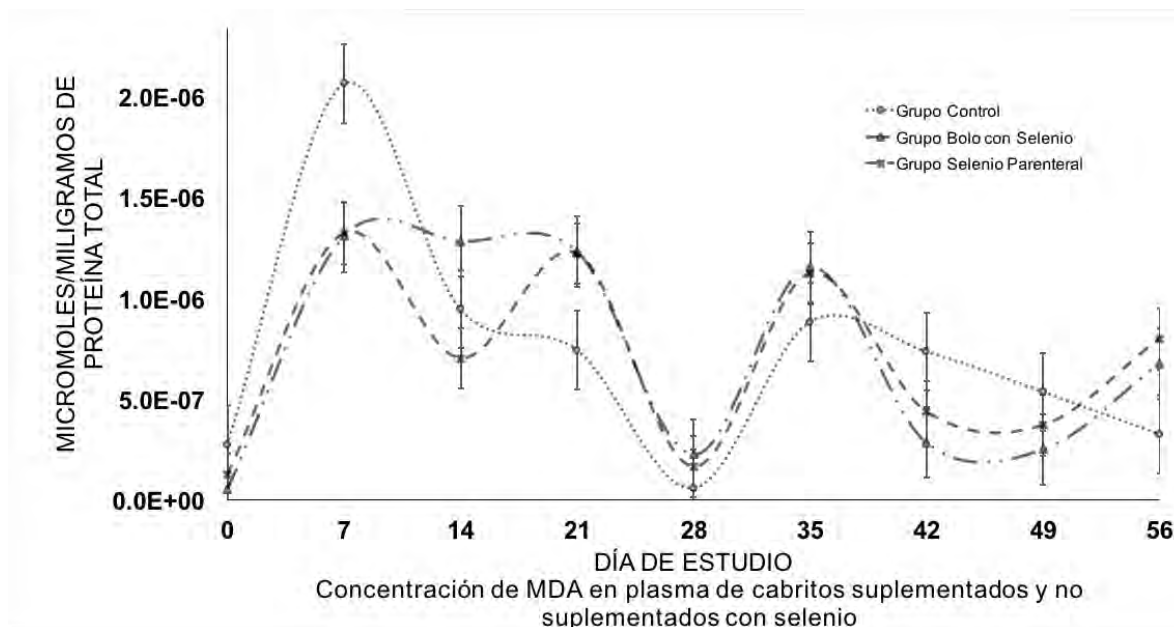
En la tabla 19 por suma de cuadrados tipo para evaluar la concentración plasmática de MDA en los grupos de estudio prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.9733, que corresponde al Grupo. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. De la misma forma el valor-P 0.0559 correspondiente al Día de Estudio mayor que 0.05, ese término tampoco es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 17. Medias de la concentración plasmática de MDA por grupo de estudio dentro del experimento



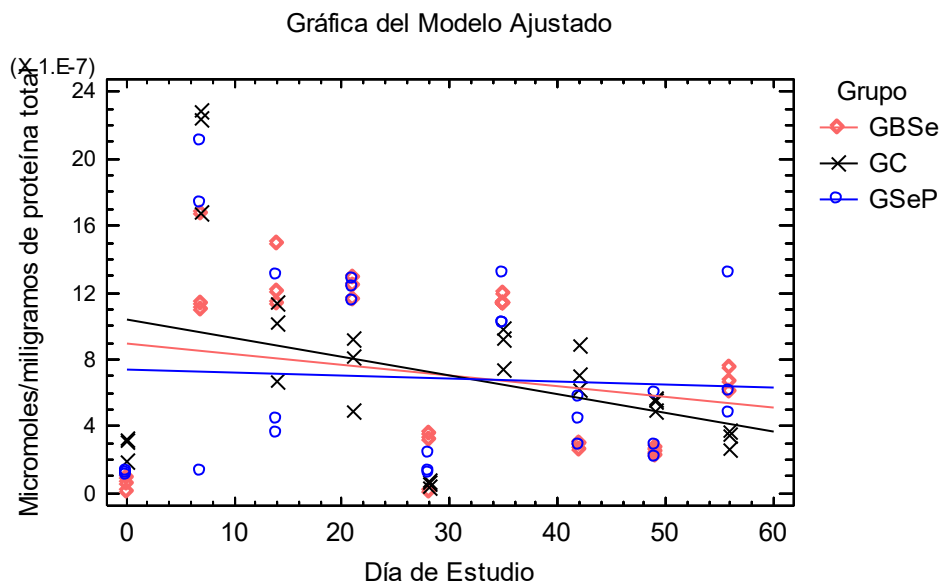
En la Figura 17 se observan las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento en la evaluación de la concentración plasmática de MDA de los grupos en el experimento. Se observa que no hay diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio para esta variable $P > 0.05$.

Figura 18. Concentración de MDA plasmática en los grupos de estudio en el experimento



En la Figura se observa la concentración de MDA en los grupos de estudio a través del experimento. En el día 0 se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos de estudio ($P > 0.05$), promediando $1.49 \mu\text{moles}$ de MDA. Para el día 7 GC presenta 2.06×10^{-6} $1.49 \mu\text{moles}$ de MDA, siendo diferente ($P < 0.05$) a los promediado por GBSe y GSeP ($1.69 \times 10^{-6} \mu\text{moles}$ de MDA) sin diferencia estadística entre ellos ($P > 0.05$). En el día 14 no hay diferencias significativas entre los grupos de estudio ($P > 0.05$), promediando $9.75 \mu\text{moles}$ de MDA. En el día 21 los grupos suplementados con Se presentan las mayores concentraciones de MDA sin diferencia entre ellos ($P > 0.05$), promediando $1.23 \times 10^{-6} \mu\text{moles}$ de MDA, mientras que GC tiene menores concentraciones a diferencia de los grupos suplementados ($P < 0.05$) con $7.42 \times 10^{-7} \mu\text{moles}$ de MDA. A partir del día 28 y hasta el día 56 no se observan diferencias ($P > 0.05$) promediando 1.48×10^{-7} , 1.05×10^{-6} , 4.84×10^{-7} , 3.84×10^{-7} y $5.98 \times 10^{-7} \mu\text{moles}$ de MDA.

Figura 19. Concentraciones plasmáticas de MDA en los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 19 se muestra el gráfico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere a las concentraciones plasmáticas de MDA. Se observa que GSeP se mantiene con concentraciones uniformes durante el experimento mientras que GBSe y GC tienen una disminución en sus concentraciones plasmáticas de MDA, empezando al estudio con valores más altos que GSeP. GC empieza el estudio con las mayores concentraciones plasmáticas de MDA y al finalizar el estudio es que grupo con menores concentraciones plasmáticas de MDA.

6.8. Evaluación de la concentración de GSH en plasma de los animales en los grupos de estudio

Se realizó la evaluación de la concentración de GSH en plasma de los animales de los grupos experimentales. Se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia estadística para este parámetro, considerando un valor $P < 0.05$, el cual se puede observar en la tabla 20, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 21. También se realizó una gráfica con medias y

errores estándar para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales en lo que se refiere a la concentración plasmática de GSH, la cual se puede observar en la Figura 20; las concentraciones promedio de GSH se graficaron por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 21. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 22.

Tabla 20. Análisis de varianza para la concentración de GSH en plasma de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000738219	3	0.0000246073	11.65	0.0000
Residuo	0.000162681	77	0.00000211274		
Total (Corr.)	0.000236503	80			

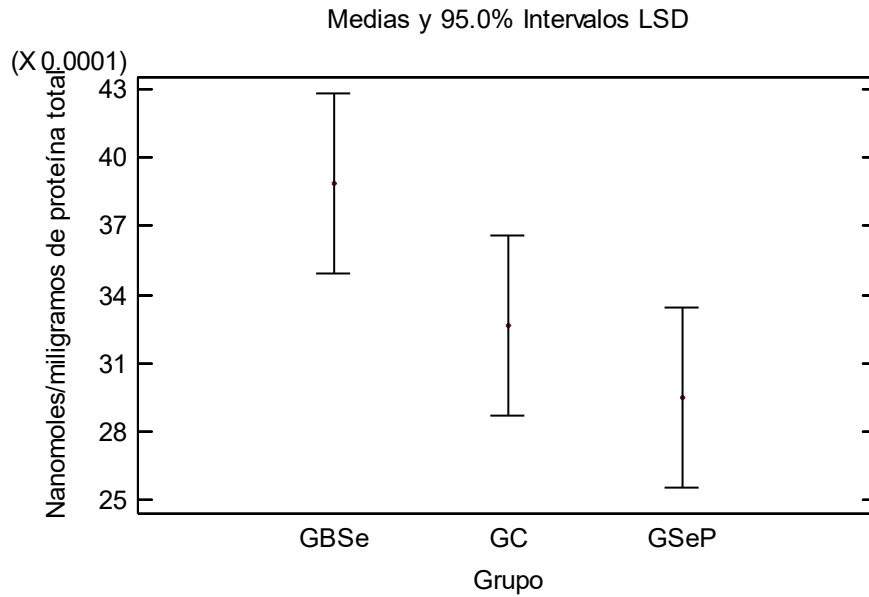
Esta tabla 20 se resume los resultados del análisis de varianza para la concentración de GSH en plasma. Dado que el valor-P en el ANOVA para GSH plasmático es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre GSH plasmático y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 21. Suma de cuadrados tipo III para la concentración de GSH en plasma de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	0.0000122788	2	0.00000613938	2.91	0.0607
Día de Estudio	0.0000615431	1	0.0000615431	29.13	0.0000
Residuo	0.000162681	77	0.00000211274		
Total (corregido)	0.000236503	80			

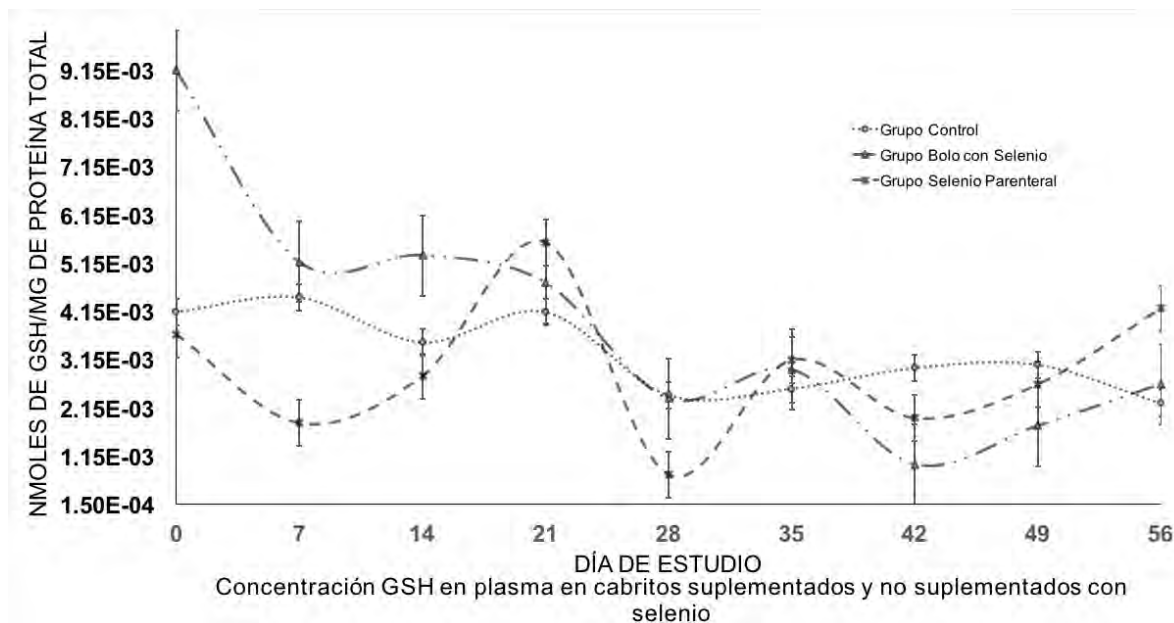
En la tabla 20 muestra el análisis por suma de cuadrados tipo III para la evaluación de la concentración de GSH plasmático, esta prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.0607, que corresponde al Grupo. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. Sin embargo, el valor-P 0.0000 correspondiente al Día de Estudio tiene un valor-P menor que 0.05, por lo que es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 20. Medias de la concentración plasmática de GSH por grupo de estudio dentro del experimento



En la Figura 20 se observan las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento en la evaluación de la concentración plasmática de GSH de los grupos en el experimento. Se observa que GBSe tiene las mayores concentraciones de GSH plasmático $P < 0.05$ que GC y GSeP, mientras que estos dos grupos no muestran diferencias entre ellos $P > 0.05$ en el presente estudio.

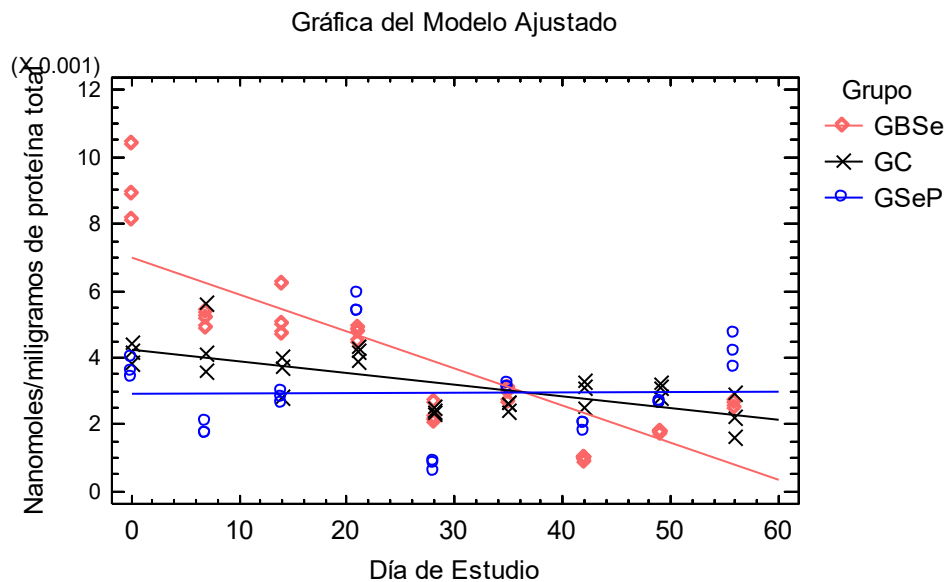
Figura 21. Concentración de GSH plasmática en los grupos de estudio en el experimento



En la figura se observa la concentración de GSH en plasma a través del estudio para los tres grupos. Se observa que para el día 0 GBSe tiene mayor concentración de GSH ($P < 0.05$) teniendo una concentración para este día de $9.13E-3$ nanomoles/g de proteína a diferencia de GC y GSeP los cuales promedian para este día $3.90E-3$. En el día 7 la concentración de GSH es más alta en GC y GBSe sin diferencia significativa entre ellos ($P > 0.05$) promediando para este día $4.80E-3$ nanomoles/g de proteína, siendo diferente ($P < 0.05$) a GSeP $1.83E-3$ nanomoles/g de proteína. En el día 14 los niveles de GSH de GBSe se mantienen similares con $5.30E-3$ nanomoles/g de proteína, sin embargo, estos son más altos ($P < 0.05$) a los promediados por GC y el GSeP el cual es, $3.15E-3$ nanomoles/g de proteína. En el día 21 no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tres grupos de estudio, promediando para este día $4.81E-3$ nanomoles/g de proteína. Para el día 28 solo GSeP disminuye su concentración de GSH plasmática a diferencia de GC y GBSe ($P < 0.05$) ($7.70E-4$ nanomoles/g de proteína vs $2.37E-3$ nanomoles/g de proteína). En el día 35 no se observan diferencias significativas entre grupos, promediando $2.87E-3$ nanomoles/g de proteína. En el día 42 solo GC tiene los mayores niveles de GSH a diferencia de los grupos suplementados con Se ($P < 0.05$) ($2.97E-3$

nanomoles/g de proteína vs $1.45E-3$ nanomoles/g de proteína). En el día 49 no se aprecian diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$) promediando $2.48E-3$ nanomoles/g de proteína. Por último, en el día 56 GSeP tiene los mayores niveles de GSH ($4.20E-3$ nanomoles/g de proteína) a diferencia de GC y GBSe ($P > 0.05$) los cuales promedian para este día $2.43E-3$ nanomoles/g de proteína.

Figura 22. Concentraciones plasmáticas de GSH en los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 22 se muestra el grafico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere a las concentraciones plasmáticas de GSH. Se observa que GSeP se mantiene con concentraciones uniformes durante el experimento mientras que GBSe y GC tienen una disminución en sus concentraciones plasmáticas de GSH, empezando al estudio con valores más altos que GSeP. GBSe empieza el estudio con las mayores concentraciones plasmáticas de GSH y al finalizar el estudio es que grupo con menores concentraciones plasmáticas de GSH.

6.9. Evaluación de la concentración de GSH en eritrocitos de los animales en los grupos de estudio

Se realizó la evaluación de la concentración de GSH en eritocitos de los animales de los grupos experimentales. Se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia estadística para este parámetro, considerando un valor $P < 0.05$, el cual se puede observar en la tabla 22, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 23. También se realizó una gráfica con medias y errores estándar para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales en lo que se refiere a la concentración de GSH en eritrocitos, la cual se puede observar en la Figura 23; las concentraciones promedio de GSH se graficaron por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 24. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 25.

Tabla 22. Análisis de varianza para la concentración de GSH en eritrocitos de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.24541E-7	3	4.15136E-8	0.35	0.7891
Residuo	0.00000912708	77	1.18534E-7		
Total (Corr.)	0.00000925162	80			

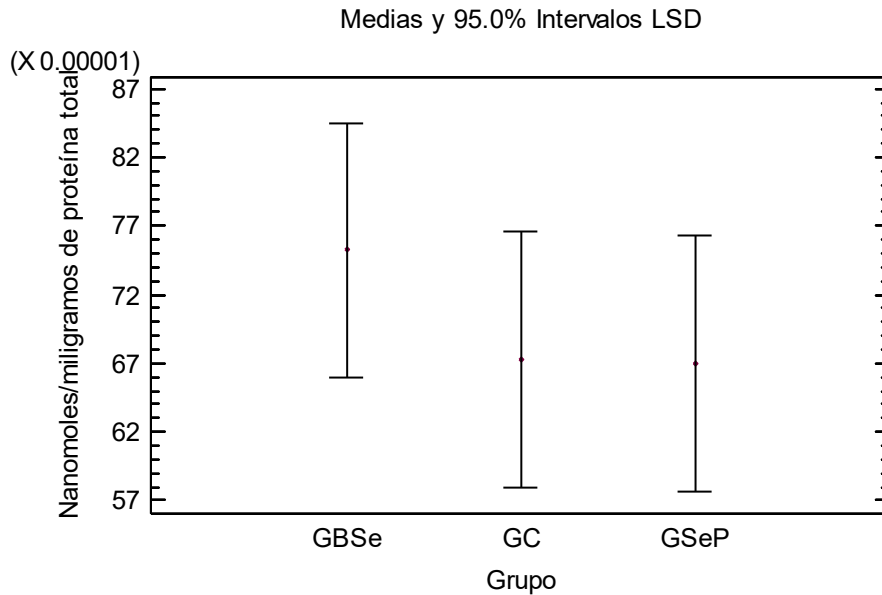
En la tabla 22 resume los resultados del análisis de varianza para la evaluación de la concentración de GSH en eritrocitos. Dado que el valor-P en la tabla ANOVA para el GSH eritrocitario es mayor o igual que 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre el GSH eritrocitario y las variables predictoras (Grupo experimental y/o Día de estudio) con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 23. Suma de cuadrados tipo III para la concentración de GSH en eritrocitos de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	1.18607E-7	2	5.93037E-8	0.50	0.6083
Día de Estudio	5.93352E-9	1	5.93352E-9	0.05	0.8236
Residuo	0.00000912708	77	1.18534E-7		
Total (corregido)	0.00000925162	80			

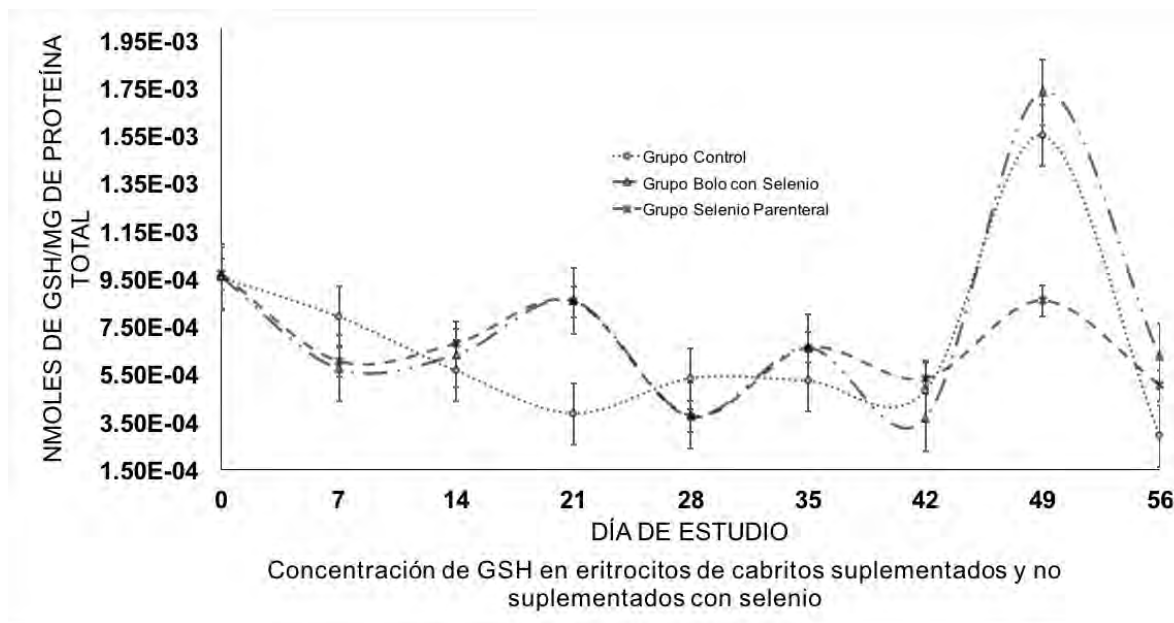
La tabla 23 muestra el análisis hecho a partir de una suma de cuadrados tipo III para la evaluación de la concentración de GSH eritrocitario, este prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.8236, que corresponde al Día de Estudio. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. De la misma forma el valor-P 0.6083 correspondiente al Grupo es mayor que 0.05, por lo que este término tampoco es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 23. Medias de la concentración de GSH en eritrocitos por grupo de estudio dentro del experimento



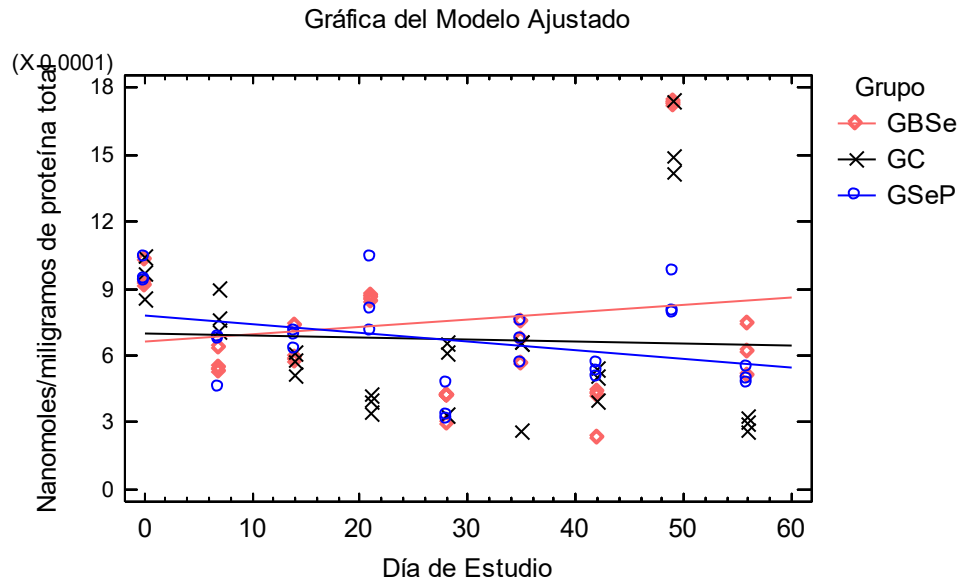
En la Figura 23 se observan las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento en la evaluación de la concentración de GSH en eritrocitos de los grupos en el experimento. Se observa que no hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos en el presente estudio $P > 0.05$.

Figura 24. Concentración de GSH en eritrocitos en los grupos de estudio en el experimento



En la Figura se muestran las concentraciones de GSH en eritrocitos. No se observan diferencias significativas entre grupos del día 0 al día 14 ($P > 0.05$) promediando para estos días $9.60E-4$, $6.60E-4$ y $6.20E-4$ nanomoles/g de proteína respectivamente. En el día 21 se observa que los grupos suplementados con Se tienen mayores concentraciones de GSH en eritrocitos, promediando $8.60E-4$ nanomoles/g de proteína, a diferencia de GC ($P < 0.05$) con $3.80E-4$ nanomoles/g de proteína. Del día 28 al 42 no hay diferencias significativas entre grupos ($P > 0.05$) con valores promedio de $4.3E-4$, $6.1E-4$ y $4.6E-4$ nanomoles/g de proteína respectivamente. Para el día 49 GC y GBSe presentan mayores niveles de GSH en eritrocitos a diferencia del GSeP ($P < 0.05$) ($1.64E-3$ nanomoles/g de proteína vs $8.60E-4$ nanomoles/g de proteína). Para el día 56 los grupos suplementados con Se presentan los mayores niveles de GSH en eritrocitos a diferencia de GC ($P < 0.05$) ($5.60E-4$ nanomoles/g de proteína vs $2.90E-4$ nanomoles/g de proteína).

Figura 25. Concentraciones de GSH en eritrocitos de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 25 se muestra el gráfico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere a las concentraciones de GSH en eritrocitos. Se observa que GC mantiene concentraciones uniformes durante el experimento mientras que GSeP empieza con concentraciones eritrocitarias de GSH más altas que GC, sin embargo, a lo largo del experimento estas disminuyen incluso por debajo de GC. Por otro lado, GBSe comienza el estudio con las concentraciones más bajas y estas van aumentando a través del estudio, donde al final este grupo tiene las concentraciones más altas de GSH en eritrocitos.

6.10. Evaluación de las absorbancias para IgG en suero de los animales en los grupos de estudio

Se realizó la evaluación de las absorbancias para IgG en suero de los animales de los grupos experimentales. Se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia estadística para este parámetro, considerando un valor $P < 0.05$, el cual se puede observar en la tabla 24, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 25. También se realizó una gráfica con medias y errores estándar para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales en lo que se refiere a las observancias de IgG, la cual se puede observar en la Figura 26; las absorbancias se graficaron por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 27. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 28.

Tabla 24. Análisis de varianza para IgG en suero de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	5.28412	3	1.76137	39.90	0.0000
Residuo	3.39918	77	0.0441452		
Total (Corr.)	8.6833	80			

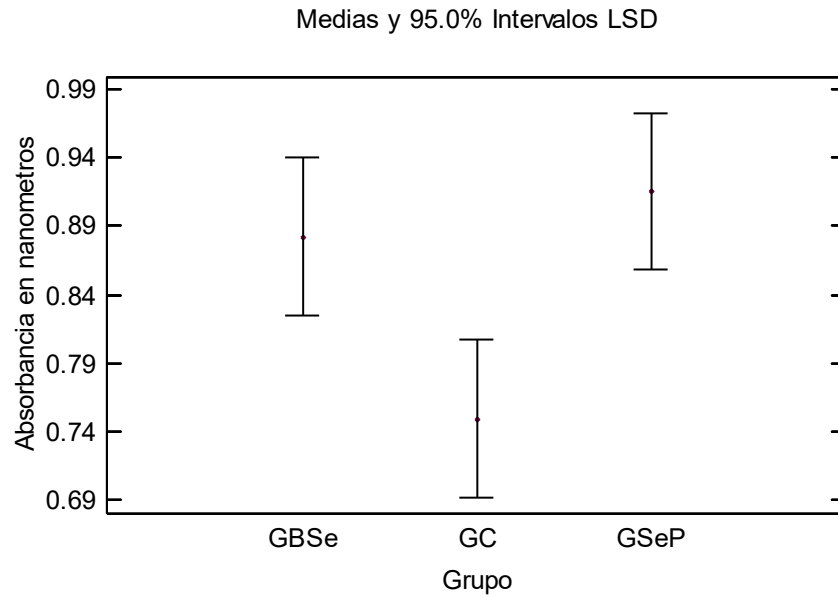
En la tabla 24 se resume el análisis de varianza para las absorbancias de IgG en suero de los grupos de estudio. Dado que el valor-P en la tabla ANOVA para IgG es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre IgG y las variables predictoras (Grupo de estudio y/o Día de estudio) con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 25. Suma de cuadrados tipo III para IgG en suero de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	0.412709	2	0.206354	4.67	0.0121
Día de Estudio	4.87141	1	4.87141	110.35	0.0000
Residuo	3.39918	77	0.0441452		
Total (corregido)	8.6833	80			

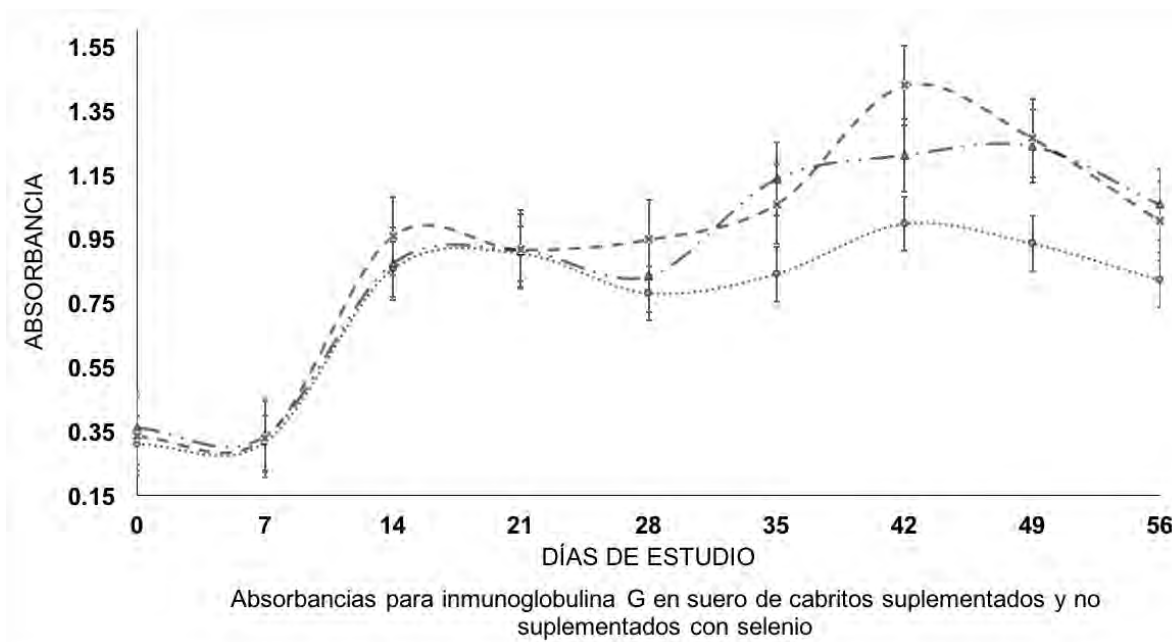
La tabla 25 muestra el análisis a través de la suma de cuadrados tipo III para las absorbancias para IgG en suero de los grupos de estudio, esta prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.0121, que corresponde al Grupo. Dado que el valor-P es menor que 0.05, ese término es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. Así mismo el valor-P 0.0000 correspondiente al Día de Estudio es menor que 0.05, por lo que también es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 26. Medias de las absorbancias obtenidas para IgG en suero por grupo de estudio dentro del experimento



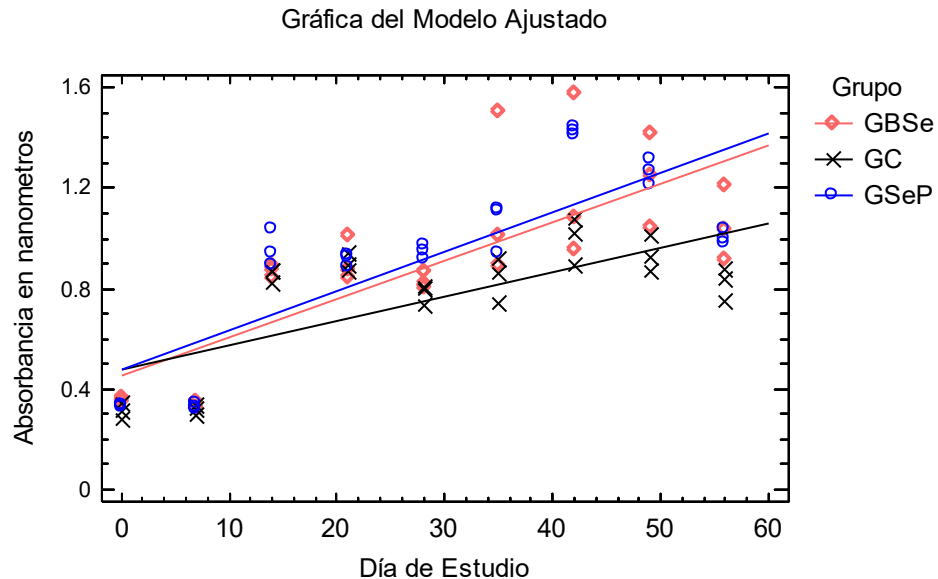
En la Figura 26 se observan las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento en la evaluación de las absorbancias para IgG en suero de los grupos en el experimento. Se observa que GBSe y GSeP tienen mayores absorbancias promedio en el experimento a diferencia de GC $P < 0.05$, sin embargo, estos dos grupos suplementados no muestran diferencia significativa entre ellos $P > 0.05$.

Figura 27. Absorbancias para IgG en suero de los grupos de estudio en el experimento



En la Figura se observan las absorbancias obtenidas para IgG en suero de los grupos de estudio. Del día 0 al día 28 no se observan diferencias significativas en los grupos de estudio con absorbancias promedio de 0.334, 0.324, 0.895, 0.910 y 0.852 respectivamente. A partir del día 35 y hasta el día 49 se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos suplementados con Se y GC. En el día 35 los grupos suplementados con Se promedian 1.096 de absorbancia a diferencia de GC que tiene 0.839 de absorbancia para IgG. En el día 42 los grupos suplementados mayores absorbancias que GC $P < 0.05$, promediando 1.318 contra GC de 0.996. En el día 49 GBS_{Se} y GSeP presentan una absorbancia promedio de 1.251 y el GC tiene una absorbancia 0.934. En el día 56 no se observan diferencias significativas para los grupos de estudio $P > 0.05$, promediando una absorbancia de 0.960.

Figura 28. Concentraciones de absorbancias para IgG en suero de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 28 se muestra el gráfico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere a las absorbancias obtenidas para IgG en suero de los grupos de estudio. Se observa que los grupos suplementados con Se rápidamente muestran mayores absorbancias hasta el final del experimento, siendo GSeP el que muestra absorbancias ligeramente más altas que GBSe.

6.11. Evaluación de la hemoaglutinación indirecta para *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 y A2 en suero de los animales en los grupos de estudio a través del título de anticuerpos

Se realizó la evaluación de la hemoaglutinación indirecta del suero de los animales de los grupos experimentales contra *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A2. Se realizó un análisis de varianza para observar si hubo significancia estadística para este parámetro, considerando un valor $P < 0.05$, el cual se puede observar en la tabla 26, posteriormente se realizó un análisis por suma de cuadrados tipo III para saber si hubo significancia por día y/o por grupo de estudio en la tabla 27. También se realizó una gráfica con medias y errores estándar para observar diferencias en este estudio entre grupos experimentales en lo que se

refiere al título de anticuerpos para la hemoaglutinación indirecta para los dos serotipos, la cual se puede observar en la Figura 29; estos títulos se graficaron por grupo y por día de estudio para observar diferencias para esta variable en la Figura 30. Por último, se realizó un gráfico a través de modelos lineales generalizados para observar el comportamiento de los datos a través de los días de estudio por grupo experimental el cual se puede observar en la Figura 31.

Tabla 26. Análisis de varianza para hemoaglutinación para A1 en suero de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2.93025	3	0.976749	3.67	0.0158
Residuo	20.5019	77	0.266258		
Total (Corr.)	23.4321	80			

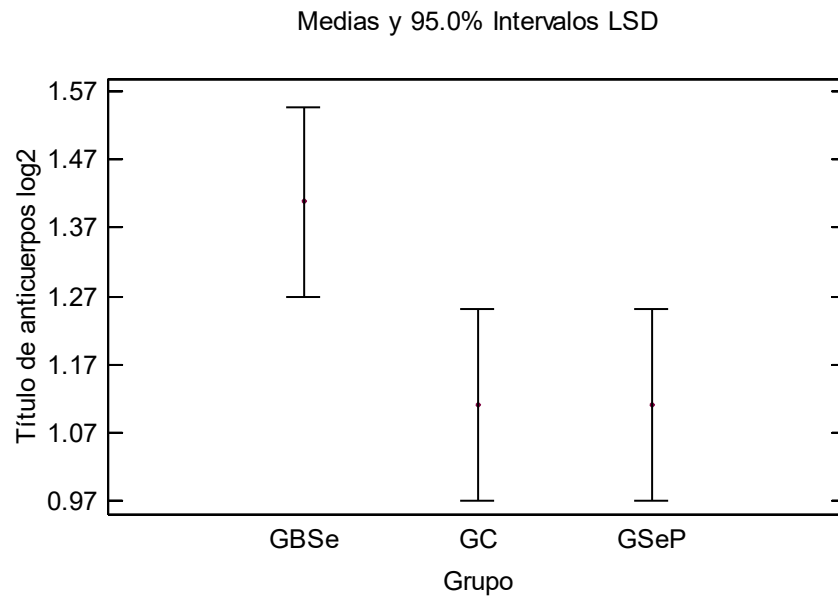
La tabla 26 resume el análisis de varianza para evaluar el título de hemoaglutinación para *Mannheimia haemolytica* serotipo A1. Dado que el valor-P en la tabla ANOVA para la hemoaglutinación indirecta para *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre *Mannheimia haemolytica* A1 y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 27. Suma de cuadrados tipo III para hemoaglutinación para A1 en suero de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	1.58025	2	0.790123	2.97	0.0573
Día de Estudio	1.35	1	1.35	5.07	0.0272
Residuo	20.5019	77	0.266258		
Total (corregido)	23.4321	80			

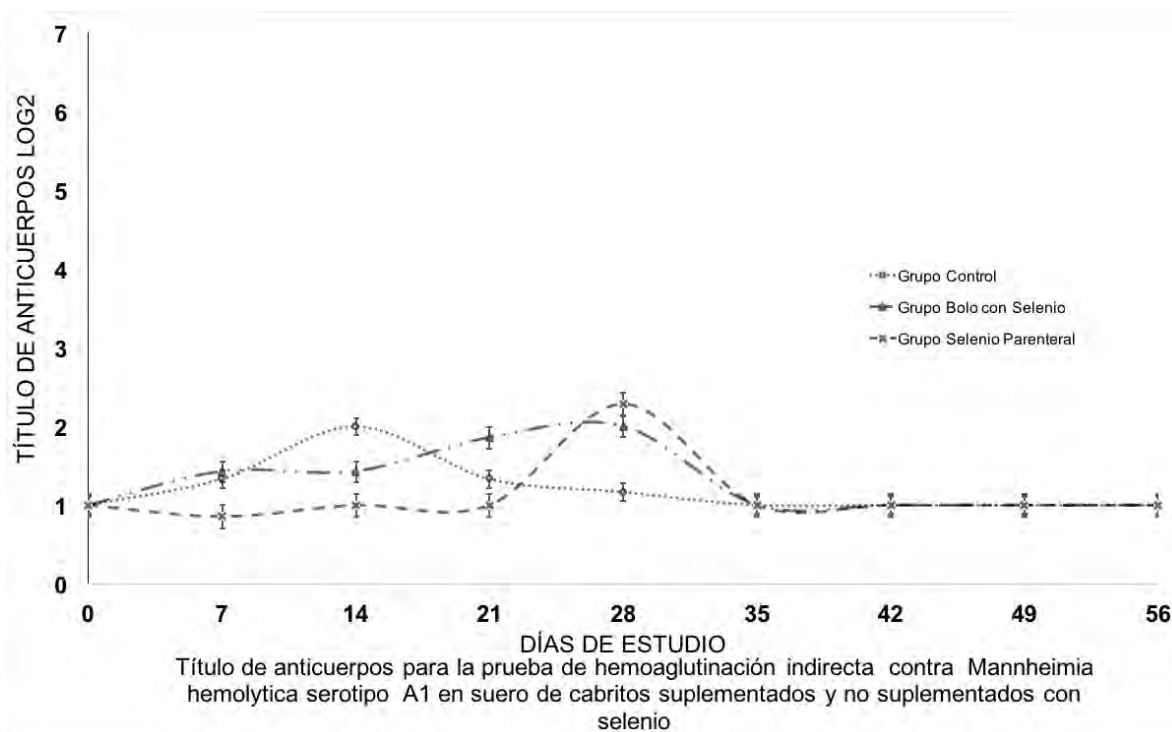
La tabla 27 muestra el análisis realizado por suma de cuadrados tipo III para evaluar la hemoaglutinación indirecta para *Mannheimia haemolytica* serotipo A1, la cual prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.0573, que corresponde al Grupo. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. Sin embargo, el valor-P 0.0272 correspondiente al Día de estudio es menor que 0.05, resulta estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 29. Medias de los títulos de anticuerpos para hemoaglutinación indirecta de los sueros contra *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 por grupo de estudio dentro del experimento



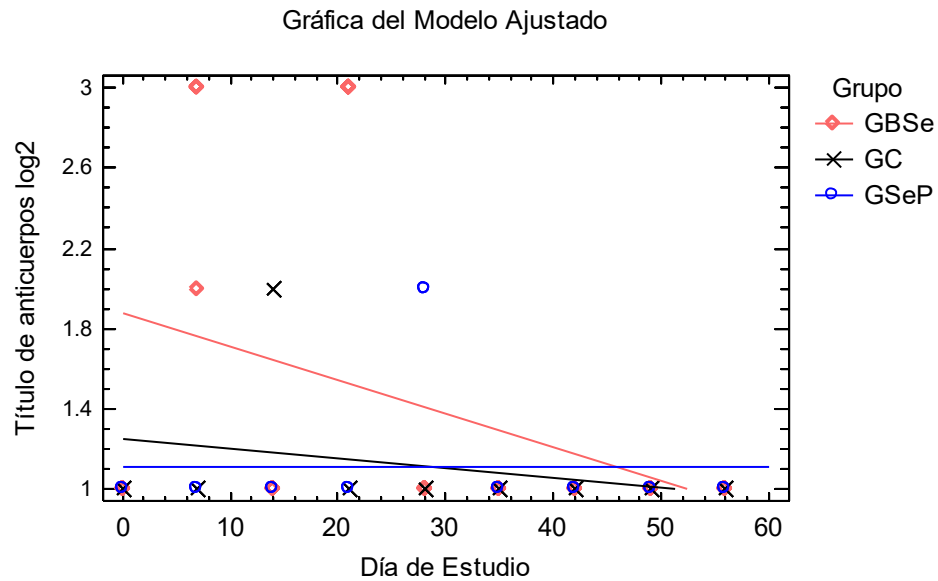
En la Figura 29 se observan las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento en la evaluación de la hemoaglutinación de los sueros de los grupos en el experimento para *Mannheimia haemolytica* serotipo A1. Se observa que GBSe tiene mayor título de hemoaglutinación $P < 0.05$ que GC y GSeP, estos últimos sin diferencia significativa entre ellos $P > 0.05$.

Figura 30. Títulos para la prueba de hemoaglutinación indirecta contra *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 en suero de los grupos de estudio en el experimento



En la Figura 30 se muestra el título para la prueba de hemoaglutinación indirecta de los grupos de estudio contra *Mannheimia haemolytica* serotipo A1. En el día 0 se observa que no hay diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio ($P < 0.05$), tendiendo un título de 1 para todos los grupos. En el día 7 se observa que GSeP es el que tiene menores títulos ($P < 0.05$) a diferencia de GC y GBSe en promedio (0.857 vs 1.381 respectivamente) estos dos últimos grupos sin diferencia estadística significativa ($P > 0.05$). En el día 14 se observa una diferencia entre los tres grupos $P < 0.05$ con títulos de 1, 1.429 y 2 respectivamente. De igual forma en el día 21 se observa una diferencia entre los tres grupos $P < 0.05$ con títulos de 1, 1.333 y 1.857 respectivamente. En el día 28 los grupos suplementados con Se tienen mayores títulos, sin diferencia entre ellos ($P < 0.05$), promediando estos un título de 2.143, siendo estos diferentes al título de GC con 1.167 ($P > 0.05$). A partir del día 35 al 56 no se observan diferencias significativas entre los grupos de estudio, teniendo para estos días valores de 1 ($P < 0.05$).

Figura 31. Títulos para la prueba de hemoaglutinación de los sueros contra *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 31 se muestra el gráfico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere al título para la prueba de hemoaglutinación indirecta de los sueros de los grupos de estudio para *Mannheimia haemolytica* serotipo A1. Se observa que GSeP se mantiene constante durante todo el estudio, mientras que GC y GBSe empiezan el estudio con mayores títulos, siendo GBSe el más alto, para después disminuir hasta el final del experimento donde tienen menores títulos que GSeP.

Tabla 28. Análisis de varianza para hemoaglutinación para A2 en suero de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4.18025	3	1.39342	2.20	0.0942
Residuo	48.6593	77	0.631938		
Total (Corr.)	52.8395	80			

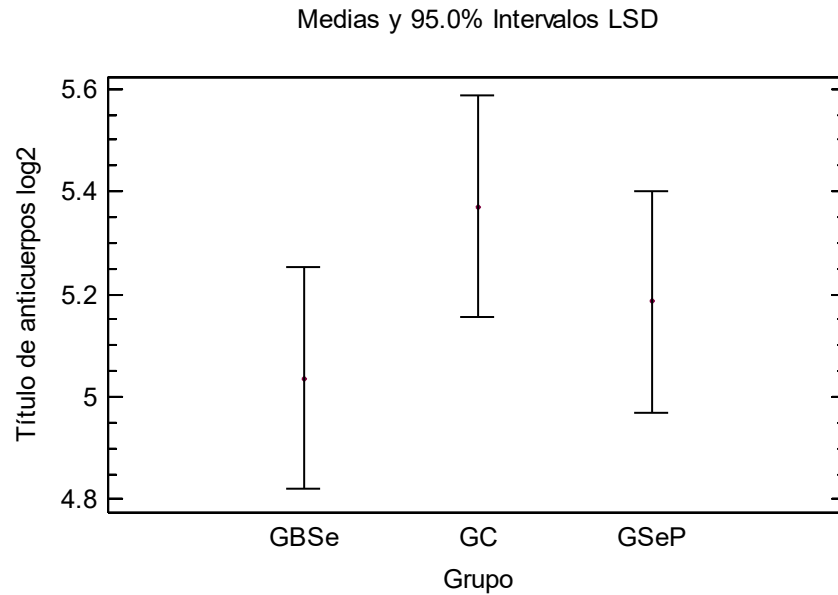
La tabla 28 resume el análisis de varianza para evaluar los títulos para la prueba de hemoaglutinación indirecta para *Mannheimia haemolytica* serotipo A2. Dado que el valor-P en la tabla ANOVA para la evaluación de la hemoaglutinación indirecta para *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 es mayor o igual que 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre la evaluación de hemoaglutinación indirecta para *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 29. Suma de cuadrados tipo III para A2 en suero de los grupos de estudio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Grupo	1.50617	2	0.753086	1.19	0.3092
Día de Estudio	2.67407	1	2.67407	4.23	0.0431
Residuo	48.6593	77	0.631938		
Total (corregido)	52.8395	80			

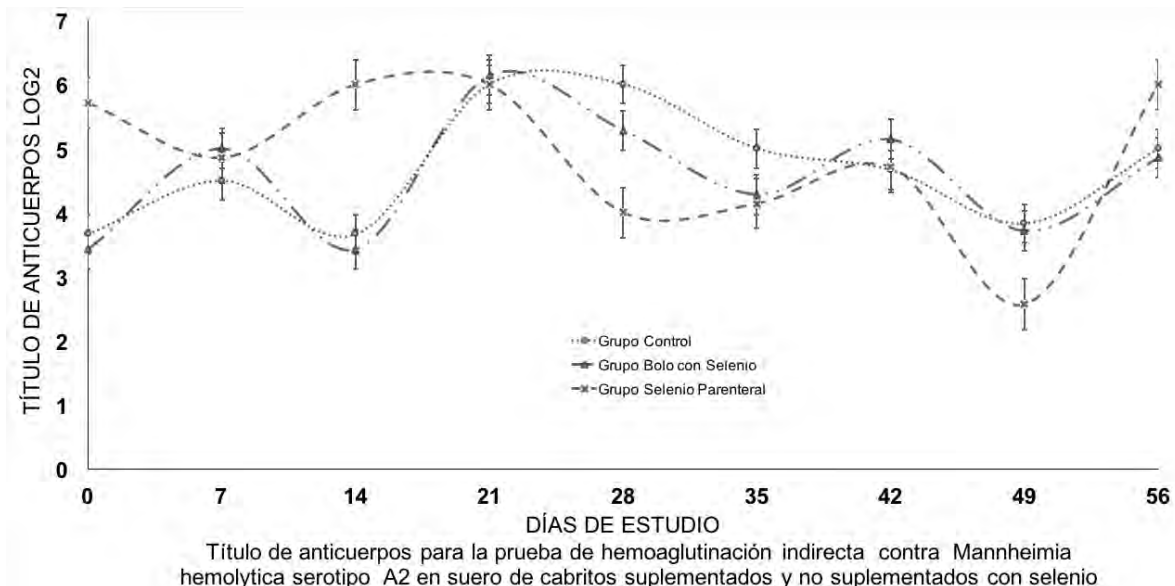
La tabla 29 muestra el análisis realizado por suma de cuadrados tipo III para evaluar la hemoaglutinación indirecta para *Mannheimia haemolytica* serotipo A2, la cual prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.3092, que corresponde al Grupo. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. Por otro lado, el valor-P 0.0431 es menor que 0.05 por lo que es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.

Figura 32. Medias de los títulos para la prueba de de hemoaglutinación indirecta de los sueros contra *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 por grupo de estudio dentro del experimento



En la Figura 32 se observan las medias por grupo y sus errores estándar dentro del experimento en la evaluación de la hemoaglutinación de los sueros de los grupos en el experimento para *Mannheimia haemolytica* serotipo A2. Se observa que no hay diferencia significativa en el título de hemoaglutinación entre grupos de estudio $P > 0.05$.

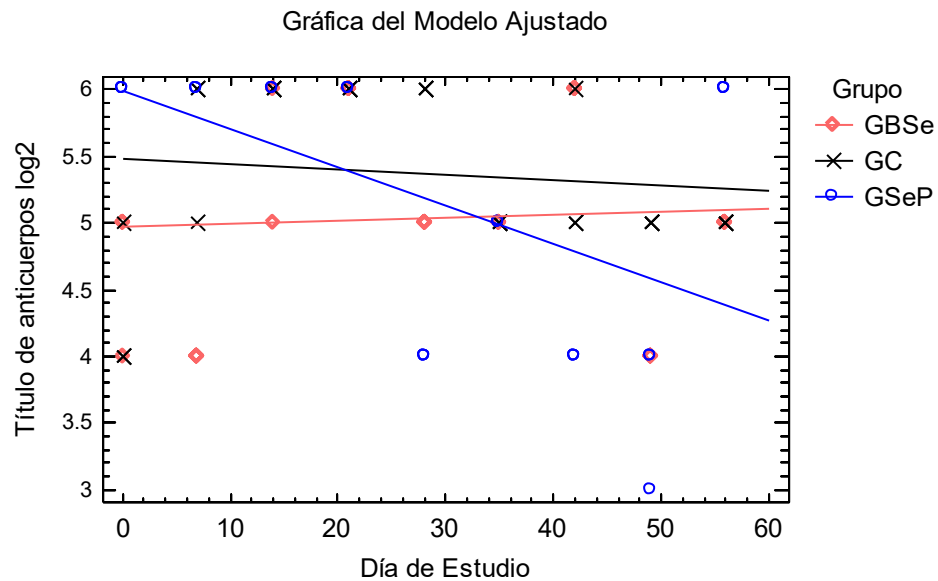
Figura 33. Título de hemoaglutinación para *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 en suero de los grupos de estudio en el experimento



En la Figura se observan los títulos de hemoaglutinación para *Mannheimia haemolytica* serotipo A2. En el día 0 se observa que GSeP presenta un título de 5.714 siendo diferente a GBSe y GC $P < 0.05$ los cuales promedian para este día un título de 3.548, estos últimos sin diferencia entre ellos ($P > 0.05$). En el día 7 no se observan diferencias significativas entre los grupos ($P > 0.05$), promediando un título de 4.785. En el día 14 se observa que GSeP tiene un título de 6, a diferencia de lo promediado por GC y GSP ($P < 0.05$), estos dos sin diferencia entre ellos ($P > 0.05$). En el día 21 no se observan diferencias significativas entre los grupos, promediando un título de 6.048 ($P > 0.05$). En el día 28 se observa que todos los grupos son diferentes ($P < 0.05$), GC tiene un título de 6, GBSe 5.286 y GSeP 4. Para el día 35 se observa que el GC tiene un título de 5 a diferencia de los grupos suplementados con Se ($P < 0.05$), en los que no se observa diferencia significativa entre ellos ($P > 0.05$) promediando un título de 4.215. En el día 42 no se observan diferencias significativas entre los grupos, promediando un título de 4.841 ($P > 0.05$). Para el día 49 GC y GBSe presentan los mayores títulos sin diferencia entre ellos ($P > 0.05$) promediando 3.774, sin embargo, estos grupos son diferentes a GSeP ($P < 0.05$) el cual presenta para este día un título de 2.571. Por último, para el día 56 el GSeP

tiene los mayores títulos con 6, encontrando una diferencia ($P < 0.05$) con GC y GBSe los cuales no presentan diferencia entre ellos ($P > 0.05$), por lo que promedian 4.929.

Figura 34. Título para la prueba de hemoaglutinación de los sueros contra *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 de los grupos de estudio por Modelos Lineales Generalizados



En la Figura 34 se muestra el grafico realizado a través del análisis hecho por Modelos Lineales Generalizados donde se puede observar el comportamiento de los grupos de estudio en lo que se refiere al título de los anticuerpos de los sueros de los grupos de estudio para *Mannheimia haemolytica* serotipo A2. Se observa que GBSe se mantiene estable durante el experimento, mientras que GC y GSeP comienzan el estudio con valores más altos siendo GSeP el más alto de los tres, para después ir disminuyendo su valor hasta tener los valores más bajos al final del experimento.

7. Discusión

En el presente trabajo se logró aumentar los niveles de Se en los cabritos suplementados por las dos vías de administración, inyección subcutánea o administración oral a través de bolos intrarruminales como demuestran las mediciones hechas en los eritrocitos de los animales. Se logró también apreciar una modulación del estrés oxidativo en los grupos suplementados con Se. Por último, se evaluó la respuesta inmunitaria contra *Mannheimia haemolytica* en cabritos a través de la IgG y su asociación con la concentración de Se en los grupos de estudio y su relación con marcadores del estrés oxidativo.

Se realizó una evaluación sobre el peso promedio semanal de los grupos de estudio y de la ganancia de peso promedio semanal de estos grupos. Se observa que el grupo control tiene un promedio de peso mayor que los grupos suplementados con Se ($P < 0.05$), excepto en los días 21 y 56 donde no se observan diferencias entre los grupos ($P > 0.05$). Tomando en cuenta esto, es interesante observar que en la evaluación de la ganancia de peso en el día 14 después de la primera administración de la bacterina-toxoide el GSeP y GC pierden peso este último de manera significativa ($P < 0.05$) a diferencia de los grupos suplementados y es a partir del día 20 que los animales suplementados con Se tienen mejores ganancias de peso que GC, aunque sin diferencia significativa hasta el final del experimento en el día 56. Chauhan et al., 2016, observó que corderos suplementados con Se tenían mejores ganancias de peso que los animales dentro del grupo control. Por otro lado Cristaldi et al., 2005, no encontró diferencias en los pesos de ovejas castradas al final de su experimento, sin embargo no se midieron las ganancias de peso, lo cual como se observa en este experimento da datos más claros sobre lo que ocurre con los grupos experimentales. Entonces, aunque hay reportes de efectos positivos en lo que se refiere la suplementación de Se sobre la ganancia de peso, también hay resultados no favorables sobre este parámetro. Como explica Qin et al., 2007, en muchos trabajos no se ha observado algún efecto de la suplementación de Se sobre la ganancia de peso cuando en la dieta hay concentraciones normales o marginales de Se. En nuestro trabajo los animales tenían concentraciones marginales de Se en

eritrocitos lo que pudiera explicar la falta de diferencias en la ganancia de peso, aun cuando el comportamiento de los grupos suplementados es mejor como lo muestra la gráfica de modelos lineales generalizados.

En lo que se refiere al consumo de alimento, en este estudio no se observan diferencias significativas en los grupos experimentales en los grupos de estudio ($P > 0.05$). En la gráfica hecha por modelos lineales generalizados se observa que GC tiene mayor consumo de alimento durante todo el experimento, mientras que GSeP es el que tiene menor consumo de alimento. Wichtel et al., 1996, realizó un experimento para demostrar si el Se tenía influencia sobre el consumo de alimento, encontrando que en tres semanas el mineral no afectó de manera positiva el consumo de alimento en cabras Angora. El autor menciona que los efectos en parámetros productivos como el consumo de alimento y ganancia de peso se verían más adelante en las cabras suplementadas poniendo un rango aproximado de 3 meses después de la suplementación. Por su parte, Simoes Cortinhas et al., 2012, tampoco encuentra diferencias en el consumo de alimento en vacas lecheras suplementadas con minerales. Parece que este parámetro no está directamente relacionado con la suplementación de Se. Esto tal vez pueda servir como indicador de que los animales no recibieron dosis tóxicas de Se, ya que cuando esto ocurre el consumo de alimento se ve afectado de forma negativa como lo menciona Lopez-Arellano et al., 2015.

A partir de la evaluación de los niveles de Se en eritrocitos de los cabritos dentro de los grupos de estudio se esperó observar niveles que nos brindaran información acerca del estatus del mineral en los animales. Como Stefanowicz et al., 2013 menciona, aunque el plasma es comúnmente utilizado como indicador en los estudios sobre el estatus de Se en el organismo, este puede decaer rápidamente, independientemente del estatus real del mineral en el organismo durante fases agudas de respuesta, mientras que los ensayos sobre niveles de Se en eritrocitos son robustos y las concentraciones no se ven afectadas por factores como la respuesta inflamatoria sistémica. Por otra parte Qin et al., 2007 menciona que el

análisis se podría hacer en sangre completa, ya que la hemolisis de los eritrocitos durante el manejo de la muestra, podría causar falsos valores altos en plasma, dado que el Se se encuentra principalmente dentro de los eritrocitos. Por lo que hacer estudios de niveles de Se en eritrocitos resulta ser una buena opción para evitar falsos niveles como resultado de un mal manejo de la muestra.

Una de las hipótesis del presente trabajo es que la suplementación de Se aumentaría la concentración del elemento en los eritrocitos de los animales a diferencia del grupo control. Se observó que hubo un aumento significativo en los grupos suplementados a partir del día 14, considerando que los grupos de estudio no tuvieron diferencias en sus concentraciones eritrocitarias al comienzo del estudio. Puls, 1988, menciona que los niveles marginales de Se para pequeños rumiantes van de 40-80 ng de Se por gramo de muestra en sangre completa y de 30-60 ng de Se en suero. Los niveles adecuados van de 150-500 ng de Se en sangre completa y de 80-500 en suero. No hay datos que indiquen concentraciones marginales y adecuadas de Se en eritrocitos de cabritos. En el estudio hecho por van Ryssen et al., 2013 menciona que los pequeños rumiantes por debajo de 50 ng de Se por g de fluido se consideran marginalmente deficientes y Mbwiria et al., 1986 menciona que concentraciones en sangre por debajo de 50 ng por gramo de muestra puede tener repercusiones en la salud de los rumiantes. Los animales del presente estudio empezaron el experimento con un promedio de 84 ng de Se por gramo de muestra por lo que tal vez se puedan considerar marginalmente deficientes considerando los datos en sangre completa y suero. En nuestro estudio los animales tenían 6 meses de edad (aproximadamente 180d) al momento de empezar el experimento, según Stowe and Herdt, 1992 los niveles en suero deberían ser de 80-110 ng/mL de muestra, por lo que corrobora que los animales pudieran tener concentraciones marginales de Se. Para el día 28 los animales suplementados con Se llegan a su máximo nivel, con un promedio de 147 ng de Se, pudiendo ser considerados niveles adecuados considerando los que hay reportados en suero y sangre completa. Se consideran entonces que en el presente trabajo, la suplementación de Se logra aumentar los niveles del mineral en los animales hasta

niveles adecuados en eritrocitos, aunque sin diferencias entre las dos formas de suplementación.

También se planteó como hipótesis que la suplementación de Se a través de dos vías de administración, parenteral por inyección subcutánea u oral por medio de bolos intrarruminales tendrían diferencias en las concentraciones de Se eritrocitarias en el tiempo que duró el experimento. En nuestro experimento, los animales suplementados con Se aumentan sus niveles en eritrocitos a partir de 14 d y hasta 42 d, tanto en la suplementación parenteral como por vía intrarruminal sin que haya diferencia entre estas vías en todo el tiempo de experimentación. En el trabajo hecho por Gutiérrez Olvera et al., 2005, utilizó un bolo de 5g con 50 mg de Se con diferentes materiales de fabricación para liberación intrarruminal en ovejas, estos bolos mantuvieron la liberación de Se hasta 120d. En el trabajo realizado por Blanco Ochoa et al., 2000, los bolos utilizados mantienen niveles de Se hasta por 3 meses, alcanzando concentraciones de hasta 350 ng de Se por g. Esta diferencia tal vez se explica por la utilización de diferentes materiales en la fabricación de bolos intrarruminales, sin embargo, haría falta un experimento más prolongado para observar el comportamiento de nuestro bolo para saber el tiempo máximo de liberación en la suplementación en pequeños rumiantes, ya que en este estudio solo se contemplaron 60 días de observación. Gutiérrez Olvera et al., 2005 en su experimento los animales mantienen concentraciones de 148 ng/g de muestra. En nuestro trabajo al 28 d se obtuvo un promedio 147 dg de Se/g de muestra para las dos vías de suplementación, por lo que, en este trabajo ambas vías parecen ser eficaces para el mantenimiento de niveles adecuados de Se en cabritos. Para nuestro experimento en la administración parenteral se utilizó la dosis de Se recomendada por Ramírez-Bribiesca et al., 2004 de 0.25 mg/kgPV, con esta dosis se logró aumentar los niveles de Se en eritrocitos hasta alcanzar niveles adecuados. El autor menciona que la seguridad de la dosis para los animales depende de la concentración de Se en sangre antes de administrar los tratamientos. Como se observó, en nuestro estudio los niveles de Se se encontraban en niveles marginales. Otros factores importantes a tomar en cuenta para la dosificación de Se son la

absorción y retención de Se en tejidos como riñón e hígado que a través de la vía parenteral pudiera ser más importante por el mayor grado de absorción a través del torrente sanguíneo a diferencia de la vía ruminal la cual requiere llegar primero al intestino para su absorción y llegada al torrente sanguíneo. Davy et al., 2016, evaluó tres diferentes métodos para la suplementación de Se en bovinos, a través de premezclas, inyección subcutánea y bolos intrarruminales, el experimento duró 90 días y encontró que la mejor forma de suplementación de Se es a través de los bolos intrarruminales, los cuales mantuvieron niveles adecuados de Se en sangre por más tiempo que la inyección subcutánea. Como ya se mencionó en nuestro estudio no hay diferencias entre las formas de suplementación en los niveles de Se en eritrocitos, tal vez debido a la diferencia en la duración del experimento para observar el comportamiento del bolo intrarruminal en lo que se refiere a la liberación del mineral. El bolo intrarruminal es una forma eficaz de suplementación. Como menciona el autor, la inyección puede ser un método más fácil en lo que se refiere a la resistencia del ganado a la administración del bolo, habilidad del manipulador y a veces tiempo. En nuestro estudio el bolo intrarruminal fue la forma más eficaz de suplementación ya que la solución parenteral requería dos administraciones con intervalos de 15 d como lo sugería el producto comercial, lo que dificultaba el manejo de los animales, lo cual se podría ver reflejado en la granja con un número mayor de animales; el bolo solo se administró una vez de forma manual y resultó adecuado aumentando los niveles de Se en cabritos, sin observar regurgitación del mismo por los animales.

Se evaluó la suplementación de Se y su influencia en la actividad antioxidante, por lo cual se evaluó la actividad de CAT en los grupos de estudio, para observar diferencias significativas entre los grupos suplementados y el control. Se observó que la actividad de CAT fue mayor al comienzo del estudio sin que hubiera diferencia estadística entre ellos ($P > 0.05$), sin embargo, se observa que la concentración de Se en eritrocitos al inicio del experimento las cuales son bajas y las concentraciones altas de CAT, lo que podría ser un indicador del organismo para tratar de modular el estrés oxidativo por la carencia de Se. Conforme se modifican

las concentraciones de Se en los animales, también se ven modificadas la actividad de CAT, disminuyendo su actividad a través del tiempo. Al final del experimento se observa que el grupo control presenta mayor actividad de CAT para 56d. Se ha observado en corderos afectados con la enfermedad de músculo blanco a causa de la falta de Se que la actividad de CAT se ve afectada observándose disminuida a diferencia de animales no deficientes (Suleyman et al., 2007). En el trabajo realizado por Zoidis et al., 2010, se expresa que la falta de Se causa una mayor transcripción del gen CAT. Por el contrario, en el estudio de Olisekodiaka et al., 2015 se midieron las concentraciones de Se y la actividad de CAT en conejos alimentados con ajo, el cual tiene altos niveles de Se y se encontró que al mismo tiempo que aumentan las concentraciones de Se, también aumentan la concentración de CAT. Ghneim and Al-Sheikh, 2011 suplementó con Se cultivos celulares de fibroblastos humanos, no encontrando diferencias estadísticas significativas de la actividad de CAT entre los células suplementadas con Se y no suplementadas. No hay reportes de actividad de CAT en eritrocitos de cabra por lo que este trabajo puede ser un buen indicador de la enzima en eritrocitos caprinos, aunque faltaría realizar un experimento más amplio con animales realmente deficientes en el mineral para observar el efecto de la suplementación de Se en los indicadores de estrés oxidativo como es CAT. La bacterina-toxoide contra *Mannheimia haemolytica* se administró a los grupos de estudio en 7d y se realizó una segunda administración en 21d, se observa que después de la primera administración de la bacterina-toxoide hay un aumento en la actividad de CAT en los grupos suplementados en 14d con diferencias significativas con el grupo control ($p < 0.05$). No se observan diferencias entre los grupos en la actividad de CAT posterior a la segunda administración de la bacterina-toxoide.

Otro indicador de estrés oxidativo es MDA, el cual se midió a través de la prueba TBARS, para medir daño a través de la lipoperoxidación. En el presente estudio se esperaba que la cantidad de MDA se viera modificada por la suplementación de Se en los grupos de estudio, disminuyendo las concentraciones de MDA en los grupos suplementados. La determinación de la actividad enzimática antioxidante y las concentraciones de MDA son los métodos más usados para la determinación de

estrés oxidativo. En el caso de la medición de la concentración de MDA no se encontraron diferencias significativas en los grupos de estudio en todo el experimento ($P>0.05$). Sin embargo, se puede notar que en 14d hay una mayor concentración de MDA en los animales que coincide con la disminución de la concentración de GSH posterior a la primera administración de la bacterina-toxoide, esto coincide con lo que menciona Kizil et al., 2007, este aumento en la concentración de MDA se deba posiblemente a la primera administración de la bacterina y a un desbalance en el estrés oxidativo. Como menciona Kohen and Nyska, 2002, un incremento de MDA en plasma es indicador de lipoperoxidación y por lo tanto daño celular. En nuestro trabajo el Se no logró disminuir de forma significativa la concentración de MDA en los grupos de estudio, sin embargo, se observa que la concentración de MDA va disminuyendo a través de los días por lo que tal vez la suplementación de Se logra modular las concentraciones de MDA como lo observó en su trabajo Elsheikh et al., 2014, donde se suplementó Se en cabras y se midieron biomarcadores de estrés oxidativo como el MDA, y se observó que el Se reduce la concentración de MDA mejorando la actividad de los antioxidantes. Por el contrario, en el trabajo realizado por Chung et al., 2007 donde se suplementó Se en cabras, se midieron las concentraciones de MDA en intestino, suero, hígado y músculo, no se observan diferencias entre los grupos suplementados y el control al igual que en nuestro trabajo. Se tendrían que hacer más estudios para determinar si el Se tiene un efecto sobre la concentración de MDA en animales deficientes de Se. Cuando se administró la bacterina-toxoide contra *Mannheimia haemolytica* en 7d se observa que la concentración de MDA aumenta en todos los grupos de estudio en 14d, para la segunda administración las concentraciones de MDA en 28d son las más bajas sin diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($p<0.05$), de forma coincidente con la mayor concentración de Se para ese día en los grupos suplementados.

En este trabajo se esperaban diferencias en las concentraciones de GSH reducido en plasma y/o eritrocitos entre los grupos suplementados con Se y el control. En lo que se refiere a los niveles de GSH en plasma, se observa una diferencia entre los grupos suplementados con Se, donde GSeP tiene menores concentraciones de GSH que GBSe, observando que GSeP mantiene niveles estables durante todo el experimento, mientras que GBSe comienza el experimento con niveles más altos que los demás grupos, disminuyendo su concentración hasta terminar con los niveles más bajos como se observa en el gráfico por modelos lineales generalizados. En el caso de los eritrocitos, no hubo diferencias en las concentraciones de GSH al inicio del experimento en los grupos de estudio, sin embargo, en este día las concentraciones de GSH son altas y las concentraciones de Se son bajas, conforme se modifican las concentraciones de Se, también se modifican las concentraciones de GSH, tanto en plasma como en eritrocitos y es en este último donde al final del experimento. En 28d se encuentran niveles altos de Se en los grupos suplementados, para este día se observa que hay menores niveles de GSH en los grupos con Se que en GC, aunque sin diferencia estadística significativa ($p > 0.05$). Cuando incrementan los niveles de estrés oxidativo y disminuyen los niveles de Se, lo que pudiera desencadenar en una mayor liperoxidación celular, los niveles de GSH tienden a aumentar, (Richie Jr. et al., 2012). Por ejemplo, los animales viejos aumentan sus niveles de GSH eritrocitario para controlar el estrés oxidativo a consecuencia de la edad (Tekeli et al., 2015). En el trabajo realizado por Rodríguez-Patiño (datos no publicados), se midieron los niveles de GSH en eritrocitos de cabritos suplementados con Se en los cuales no se encontraron diferencias significativas. Esto hace suponer que los animales no estaban severamente deficientes en sus concentraciones de Se y por lo tanto, el balance oxidativo entre radicales oxidantes y antioxidantes se pudo haber mantenido en equilibrio. Según Celi et al., 2010, la deficiencia de Se aumenta la síntesis de GSH, lo cual podría estar relacionado con nuestros resultados. Por último, la deficiencia de Se influye en la concentración de GSH y la actividad de antioxidantes como CAT, en el trabajo hecho por Nogales et al., 2013 en ratas donde se tuvo un grupo con deficiencia de Se se pudo observar la falta de actividad

de o concentración de estos antioxidantes. La bacterina-toxoide contra *Mannheimia haemolytica* se administró a los grupos de estudio en 7d y se realizó una segunda administración en 21d, de forma coincidente se observa que en 28d el grupo control tiene mayores concentraciones de GSH aunque sin diferencias significativas ($p>0.05$).

Un objetivo importante en este trabajo fue evaluar la respuesta inmunitaria contra *Mannheimia haemolytica* a través de la administración de una bacterina-toxoide para evaluar IgG. La hipótesis para esta parte del trabajo es que el Se ayudaría a mejorar la respuesta hacia la bacterina-toxoide lo cual se verá reflejado en la concentración de IgG. No se observaron diferencias significativas en las absorbancias de IgG en los grupos de estudio los primeros 28 días del experimento ($P>0.05$), sin embargo, los grupos con Se muestran una concentración significativamente mayor de IgG a partir del día 28 después de la administración de la bacterina-toxoide y hasta el final del experimento. *Mannheimia haemolytica* es uno de los principales agentes causantes de neumonías en rumiantes, parece que la respuesta inmune del hospedador mantiene controlado el agente hasta que algún evento estresante o inmunodepresor permite la proliferación y daño bacteriano (Ackermann and Brogden, 2000; Irsik, 2010; Noyes et al., 2015). En el trabajo hecho por Rodinova et al., 2008 se suplementó a ovejas con Se y se midieron las concentraciones de IgG en las madres y sus crías encontrando que los animales suplementados tenían mayores concentraciones de IgG que los animales no suplementados. Por otro lado, en el trabajo hecho por Alhidary et al., 2016, donde se evaluó el estatus antioxidante y la respuesta inmune en camellos en suplementados con bolos de acción prolongada, se encontraron datos similares a los nuestros en lo que se refiere al comportamiento de los anticuerpos. En la primera inmunización no se observan diferencias en los grupos suplementados y los controles, después de la segunda inmunización se observan mayores diferencias entre los grupos suplementados y los no suplementados. Los minerales traza son capaces de regular la respuesta inmune por lo que son utilizados como inmunoestimulantes teniendo importancia en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Los minerales

inmunoestimulantes como el Se tienen que ver por ejemplo, con la activación del tejido con daño oxidativo, inflamación, mediadores inflamatorios, proliferación celular y fagocitosis, inmunidad específica e interacciones de las células T con células B y macrófagos (Alhidary et al., 2016; Finch and Turner, 1996; McKenzie et al., 1998). En el trabajo hecho por Hall et al., 2013, se observó que la suplementación de Se restablece la inmunidad humoral en animales afectados con la enfermedad de Gabarro, esto se logró observar estimulando la respuesta humoral a través de una proteína que fue inyectada en las ovejas de forma subcutánea.

En la prueba de hemoaglutinación indirecta para evaluar la respuesta humoral en el presente trabajo se observa que todos los grupos empiezan con el mismo título de anticuerpos para la prueba de hemoaglutinación indirecta para el serotipo A1, no así para el serotipo A2, después de la primera administración de la bacteria-toxide se observa diferencias en los títulos de anticuerpos para los dos serotipos, aunque para el serotipo A1 el título va declinando para GBSe y para A2 ocurre lo mismo para el grupo GSeP. La prueba de hemoaglutinación indirecta ha sido usada para pruebas de serotipo de *Mannheimia haemolytica* y para detectar anticuerpos contra microorganismos como virus (Bernstein and Stewart, 1971; Cho et al., 1976; Fraser et al., 1983; Levett and Whittington, 1998). Aunque no es una prueba sensible a diferencia de ELISA, nos puede dar una idea del título de anticuerpos que tiene un animal y de esta forma saber su estado inmunitario particularmente sobre la inmunidad humoral. En el trabajo hecho por Arshad et al., 2005, donde se suplementó Se en aves y posteriormente se vacunó contra infección de la bursa, se midió la respuesta humoral a través de una prueba de hemoaglutinación indirecta y en sus resultados encontraron que la suplementación de Se puede ayudar a las respuestas inmunes post vacunales, como lo encontrado en nuestros resultados. No hay trabajos parecidos al nuestro en lo que se refiere a pruebas de hemoaglutinación indirecta y su relación con la suplementación de Se en rumiantes. Es necesario hacer más experimentos en rumiantes acerca de la relación de Se con la respuesta inmune, así como su asociación con el estrés oxidativo y esto daría una mejor visión de la importancia del Se en los animales y por lo tanto en la producción animal.

8. Conclusiones

- Los tratamientos no tuvieron efecto sobre la ganancia de peso ya que no se observa diferencia significativa entre los grupos de estudio.
- Los tratamientos no tuvieron efecto sobre el consumo de alimento, ya que tampoco se observa diferencia significativa entre los grupos de estudio.
- Se logró aumentar las concentraciones de selenio en eritrocitos en los animales suplementados, sin embargo, no se observaron diferencias entre el grupo suplementado de forma parenteral y el grupo suplementado de forma oral a través de bolos intrarruminales.
- Los marcadores de estrés oxidativo parecen haber sido modulados por el Se, sin embargo, se requiere de más pruebas para corroborar esta aseveración.
- La respuesta inmune humoral fue influenciada por la suplementación de Se, de la misma forma se requieren más experimentos para corroborar los datos obtenidos en este experimento.

9. Bibliografía

- Ackermann, M.R., Brogden, K.A., 2000. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Microbes Infect.* 2, 1079–1088.
- Alhidary, I.A., Abdelrahman, M.M., Uallh Khan, R., Harron, R.M., 2016. Antioxidant status and immune responses of growing camels supplemented a long-acting multi-trace minerals rumen bolus. *Ital. J. Anim. Sci.* 15, 343–349.
- Arshad, M., Siddique, M., Ashraf, M., Khan, H., 2005. Effect of selenium supplementation on antibody titres against infectious bursal disease vaccine in broiler chicks. *Pak. Vet. J.* 25, 203–204.
- Arthur, J.R., Mckenzie, R.C., Beckett, G.J., 2003. Immunity Enhanced by Trace Elements 1457–1459.
- Awadeh, F.T., Abdelrahman, M.M., Kincaid, R.L., Finley, J.W., 1998. Effect of selenium supplements on the distribution of selenium among serum proteins in cattle. *J. Dairy Sci.* 81, 1089–1094.
- Bernstein, M.T., Stewart, J. a, 1971. Indirect hemagglutination test for detection of antibodies to Cytomegalovirus. *Appl. Microbiol.* 21, 84–9.
- Berry, M.J., 2005. Insights into the hierarchy of selenium incorporation. *Nat. Genet.* 37, 116–1163.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.
- Blanco Ochoa, M.Á., Spross Suárez, A.K., Rosiles Martínez, R., 2000. Evaluación de comprimidos intrarruminales de selenio por concentración sanguínea y lanar de corderas semiestabuladas. *Vet. Méx.* 121–127.
- Celi, P., 2010. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *Rev. Bras. Zootec. (R Bras Zootec)* 39, 348–363.
- Celi, P., Trana, A. Di, Claps, S., 2010. Effects of plane of nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. *Vet. J.* 184, 95–99. doi:10.1016/j.tvjl.2009.01.014
- Chauhan, S.S., Ponnampalam, E.N., Celi, P., Hopkins, D.L., Leury, B.J., Dunshea, F.R., 2016. High dietary vitamin E and selenium improves feed intake and

- weight gain of finisher lambs and maintains redox homeostasis under hot conditions. *Small Rumin. Res.* 137, 17–23.
- Cho, H.J., Ruhnke, H.L., Langford, E. V, 1976. The indirect hemagglutination test for the detection of antibodies in cattle naturally infected mycoplasmas. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. médecine comparée* 40, 20–9.
- Chung, J.Y., Kim, J.H., Ko, Y.H., Jang, I.S., 2007. Effects of dietary supplemented inorganic and organic selenium on antioxidant defense systems in the intestine, serum, liver and muscle of Korean native goats. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 20, 52–59. doi:10.5713/ajas.2007.52
- Combs, G.F., Gray, W.P., 1998. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther.* 79, 179–92.
- Cristaldi, L. a., McDowell, L.R., Buergelt, C.D., Davis, P. a., Wilkinson, N.S., Martin, F.G., 2005. Tolerance of inorganic selenium in wether sheep. *Small Rumin. Res.* 56, 205–213.
- Davy, J., Forero, L., Tucker, T., Mayo, C., Drake, D., Maas, J., Oltjen, J., 2016. Efficacy of selenium supplementation method in California yearling beef cattle and resulting effect on weight gain. *Calif. Agric.* 70, 187–193.
- Edwards, L.J., Overend, D.J., Ellis, K.J., 2011. Selenium supplementation: Confirmation of an effective 5-year delivery system for sheep. *Small Rumin. Res.* 95, 184–187.
- Elsheikh, A.H., Al-Hassan, M.J., Mohamed, H.E., Abudabos, A.M., 2014. Effect of injectable sodium selenite on the level of stress biomarkers in male aardi goats. *Indian J. Anim. Res.* 48, 239.
- Eyer, P., Podhradský, D., 1986. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 153, 57–66.
- Finch, J.M., Turner, R.J., 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Res. Vet. Sci.* 60, 97–106.
- Forman, H.J., Torres, M., 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166.
- Fraser, J., Donachie, W., Quirie, M., Gilmour, N.J.L., 1983. Rapid indirect

- hemagglutination test for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 18, 206–207.
- Galbraith, M.L., Vorachek, W.R., Estill, C.T., Whanger, P.D., Bobe, G., Davis, T.Z., Hall, J.A., 2015. Rumen Microorganisms Decrease Bioavailability of Inorganic Selenium Supplements. *Biol. Trace Elem. Res.* 7–12.
- Ghany-Hefnawy, A. El, López-Arellano, R., Revilla-Vázquez, A., Ramírez-Bribiesca, E., Tórtora-Pérez, J., 2007. The relationship between fetal and maternal selenium concentrations in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 73, 174–180.
- Ghneim, H.K., Al-Sheikh, Y.A., 2011. Effect of Selenium supplementation on glutathione peroxidase and catalase activities in senescent cultured human fibroblasts. *Ann. Nutr. Metab.* 59, 127–138.
- Gill, H., Walker, G., 2008. Selenium, immune function and resistance to viral infections. *Nutr. Diet.* 65, S41–S47.
- Gresakova, L., Cobanova, K., Faix, S., 2013. Selenium retention in lambs fed diets supplemented with selenium from inorganic or organic sources. *Small Rumin. Res.* 111, 76–82.
- Grotto, D., Santa Maria, L., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S.C., Pomblum, V.J., Rocha, J.B.T., Farina, M., 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova* 32, 169–174.
- Gutiérrez Olvera, C., Spross Suárez, A., Rosiles Martínez, R., Ducoing Watty, A., Ortiz Hernández, A., 2005. Blood and fecal selenium in sheep with the use of inorganic intraruminal boluses. *Vet. Méx.* 36, 313–324.
- Haenlein, G.F.W., Anke, M., 2011. Mineral and trace element research in goats: A review. *Small Rumin. Res.* 95, 2–19. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.11.007
- Hall, J.A., Vorachek, W.R., Stewart, W.C., Gorman, M.E., Mosher, W.D., Pirelli, G.J., Bobe, G., 2013. Selenium supplementation restores innate and humoral immune responses in footrot-affected sheep. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0082572
- Hall, J. a., Van Saun, R.J., Nichols, T., Mosher, W., Pirelli, G., 2009. Comparison of selenium status in sheep after short-term exposure to high-selenium-fertilized

- forage or mineral supplement. *Small Rumin. Res.* 82, 40–45.
- Hawkes, W.C., Alkan, Z., 2010. Regulation of redox signaling by selenoproteins. *Biol. Trace Elem. Res.* 134, 235–251.
- Hefnawy, A.E.G., Tórtora-Pérez, J.L., 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Rumin. Res.* 89, 185–192.
- Holben, D.H., Smith, A.M., 1999. The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins: A Review. *J. Am. Diet. Assoc.* 99, 836–843.
- Irsik, M., 2010. Bovine Respiratory Disease Associated with *Mannheimia Haemolytica* or *Pasteurella Multocida* 1. *Vet. Med. Anim. Clin. Sci. Dep.* 2–4.
- Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K., Hironaka, I., Kamata, Y., 2013. A Simple Assay for Measuring Catalase Activity : A Visual Approach. *Sci. Rep.* 3, 1–4.
- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 515–540.
- Juniper, D.T., Phipps, R.H., Ramos-Morales, E., Bertin, G., 2009a. Effect of high dose selenium enriched yeast diets on the distribution of total selenium and selenium species within lamb tissues. *Livest. Sci.* 122, 63–67.
- Juniper, D.T., Phipps, R.H., Ramos-Morales, E., Bertin, G., 2009b. Effects of dietary supplementation with selenium enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 149, 228–239.
- Karami, M., Alimon, A.R., Sazili, A.Q., Goh, Y.M., Ivan, M., 2011. Effects of dietary antioxidants on the quality, fatty acid profile, and lipid oxidation of longissimus muscle in Kacang goat with aging time. *Meat Sci.* 88, 102–108.
- Kasaikina, M. V, Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., 2012. Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1633–42.
- Kendall, N.R., Mackenzie, A.M., Telfer, S.B., 2001. Effect of a copper, cobalt and selenium soluble glass bolus given to grazing sheep. *Livest. Prod. Sci.* 68, 31–39.

- Kendall, N.R., Mackenzie, a. M., Telfer, S.B., 2012. The trace element and humoral immune response of lambs administered a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus. *Livest. Sci.* 148, 81–86.
- Khanal, D.R., Knight, A.P., 2010. Selenium: its role in livestock health and productivity. *J. Agric. Environ.* 11, 101–106.
- Kizil, O., Ozdemir, H., Karahan, M., Kizil, M., 2007. Oxidative stress and alterations of antioxidant status in goats naturally infected with *Mycoplasma agalactiae*. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 158, 326–330.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox, Reactions, and Method for Their Quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620–650.
- Kruzhel, B., Vovk, S., Małgorzata, B., Nowakowska, E., Sergei, P., 2014. Selenium in the diet of ruminants. *Acta Sci. Pol., Zootech.* 13, 5–16.
- Kuehnelt, D., Juresa, D., Francesconi, K. a, Fakhri, M., Reid, M.E., 2007. Selenium metabolites in urine of cancer patients receiving L-selenomethionine at high doses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 211–5.
- Kumar, N., Garg, a. K., Dass, R.S., Chaturvedi, V.K., Mudgal, V., Varshney, V.P., 2009. Selenium supplementation influences growth performance, antioxidant status and immune response in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153, 77–87. doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.06.007
- Lekatz, L. a, Ward, M. a, Borowicz, P.P., Taylor, J.B., Redmer, D. a, Grazul-Bilska, a T., Reynolds, L.P., Caton, J.S., Vonnahme, K. a, 2010. Cotyledonary responses to maternal selenium and dietary restriction may influence alterations in fetal weight and fetal liver glycogen in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 216–25. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.05.009
- Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Guicheney, P., Allamand, V., 2009. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1569–74. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.002
- Levett, P.N., Whittington, C.U., 1998. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. *J. Clin. Microbiol.* 36, 11–14.

- Lopez-Arellano, R., Ramirez-Bribiesca, J.E., Jaimes-Miranda, J., Tortora-Perez, J.L., Revilla-Vazquez, A.L., Rodriguez-Patiño, G., Montaña-Gomez, M.F., 2015. Pathophysiological response to experimental oral overdose of different forms of selenium in lambs. *Ann. Anim. Sci.* 15, 655–666.
- Lykkesfeldt, J., 2001. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: Comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clin. Chem.* 47, 1725–1727.
- Mahmoud, G.B., Abdel-Raheem, S.M., Hussein, H.A., 2013. Effect of combination of vitamin E and selenium injections on reproductive performance and blood parameters of Ossimi rams. *Small Rumin. Res.* 113, 103–108.
- Marek, K., Stanislaw, B., 2013. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition* 29, 713–718.
- Marnett, L.J., 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181–182, 219–222.
- Mbwiria, S.K., Dickinson, J.O., Bell, J.F., 1986. Blood selenium concentrations of sheep and goats from selected areas of Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.* 18, 159–165.
- McKenzie, R.C., Rafferty, T.S., Beckett, G.J., 1998. Selenium: an essential element for immune function. *Immunol. Today* 19, 342–5.
- Morales-Alvarez, F.J., Jaramillo-Meza, L., Oropeza-Vázquez, Z., Tórtora-Pérez, J.L., Trigo-Tavera, F.J., Espino-Rosas, G., 1993. Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Vet. Méx.* 24, 97–105.
- Nazifi, S., Saeb, M., Ghafari, N., Razeghian, I., Razavi, S.M., Vosoughi, F., Dehghani, F., Orangi, H., 2009. Reference Values of Oxidative Stress Parameters in Adult Native Iranian Goats. *Bulg. J. Vet. Med.* 12, 119–124.
- Ndiweni, N., Finch, J.M., 1996. Effects of in vitro supplementation with α -tocopherol and selenium on bovine neutrophil functions: implications for resistance to mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 67–78.
- Neathery, M.W., Varnadoe, J.L., Miller, W.J., Crowe, C.T., Fielding, a S., Blackmon, D.M., 1990. Effects of high dietary lead on the metabolism of intravenously dosed selenium-75 in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 73, 1107–12.

- Nogales, F., Ojeda, M.L., Fenutría, M., Murillo, M.L., Carreras, O., 2013. Role of selenium and glutathione peroxidase on development, growth, and oxidative balance in rat offspring. *Reproduction* 146, 659–667.
- Noyes, N.R., Benedict, K.M., Gow, S.P., Booker, C.W., Hannon, S.J., Mcallister, T.A., Morley, P.S., 2015. Mannheimia haemolytica in Feedlot Cattle: Prevalence of Recovery and Associations with Antimicrobial Use, Resistance, and Health Outcomes. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 705–713.
- Ohta, Y., Suzuki, K.T., 2008. Methylation and demethylation of intermediates selenide and methylselenol in the metabolism of selenium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 169–77.
- Olisekodiaka, J., Onuegbu, A., Igbeneghu, C., Adesiyun, A., Enitan, B., Isaac, U., 2015. Total Antioxidants Status, Selenium Concentration, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Rabbits Fed a High-Garlic Diet. *European J. Med. Plants* 5, 204–209.
- Olvera, G., Martínez, R., Watty, D., 2006. Selenium release in buffer solutions with the use of pellets made with different types of agglomerates. *Vet. Méx.* 37, 291–301.
- Pavlata, L., Mišurová, L., Pechová, A., Dvořák, R., 2012. Comparison of organic and inorganic forms of selenium in the mother and kid relationship in goats. *Czech J. Anim. Sci.* 57, 361–369.
- Puls, R., 1988. Mineral levels in animal health diagnostic data. Sherpa International, British Columbia.
- Qin, S., Gao, J., Huang, K., 2007. Effects of different selenium sources on tissue selenium concentrations, blood GSH-Px activities and plasma interleukin levels in finishing lambs. *Biol. Trace Elem. Res.* 116, 91–102. doi:10.1007/s12011-007-9019-x
- Rahmanto, A.S., Davies, M.J., 2012. Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants. *IUBMB Life* 64, 863–871. doi:10.1002/iub.1084
- Ramírez-Bribiesca, E., Hernández-Camacho, E., Hernández-Calva, L.M., Tórtora-Pérez, J.L., 2004. Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sodio en la mortalidad de corderos y los valores hemáticos de selenio. *Agrociencia* 38,

43–51.

- Ramírez-Bribiesca, J.E., Tórtora-Pérez, J., Hernández, L.M., López, R., Crosby, M., 2005. Effect of selenium-vitamin E injection in selenium-deficient dairy goats and kids on the Mexican plateau. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57, 77–84.
- Ramírez-Bribiesca, J.E., Tórtora, J.L., Hernández, L.M., Huerta, M., 2001. Main causes of mortalities in dairy goat kids from the Mexican plateau. *Small Rumin. Res.* 41, 77–80.
- Ramírez-Bribiesca, J.E., Tórtora, J.L., Huerta, M., Aguirre, a, Hernández, L.M., 2001. Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau. *Small Rumin. Res.* 41, 81–85.
- Revilla-Vázquez, A., Ramírez-Bribiesca, E., López-Arellano, R., Hernández-Calva, L.M., Tórtora-Pérez, J., García-García, E., Cruz-Monterrosa, R.G., 2008. Suplemento de selenio con bolos intrarruminales de selenito de sodio en ovinos. *Agrociencia* 42, 629–635.
- Richie Jr., J.P., Das, A., Calcagnotto, A.M., Aliaga, C.A., El-Bayoumy, K., 2012. Age Related Changes in Selenium and Glutathione Levels in Different Lobes of the Rat Prostate. *Exp Gerontol.* 47, 223–228.
- Rodinova, H., Kroupova, V., Travnicek, J., Stankova, M., Pisek, L., 2008. Dynamics of IgG in the blood serum of sheep with different selenium intake. *Vet. Med. (Praha).* 53, 260–265.
- Rose, M., Pearson, S., Cratchley, T., 2012. Effect of iodine, selenium and cobalt rumen boluses given to dry dairy cows on the immunoglobulin and thyroid hormone status of calves. *Anim. Sci. J.* 83, 543–8.
- Rosen, B.P., Liu, Z., 2009. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environ. Int.* 35, 512–515.
- Silva, J.H., Quiroga, M.A., Auza, N.J., 2000. Selenio en el rumiante. *Relaciones suelo, planta, animal. Med. Vet.* 17, 229–246.
- Simoës Cortinhas, C., de Freitas Junior, J.E., de Resende Naves, J., de Felício Porcionato, M.A., Prada e Silva, L.F., Palma Rennó, F., Veiga dos Santos, M., 2012. Organic and inorganic sources of zinc, copper and selenium in diets for dairy cows intake, blood metabolic profile, milk yield and composition. *Rev.*

- Bras. Zootec. (R Bras Zootec) 41, 1477–1483.
- Slavica, D., Cepelak, I., 2004. The facts and controversies about selenium. *Acta Pharm.* 261–276.
- Smith, K.L., Harrison, J.H., Hancock, D.D., Todhunter, D. a, Conrad, H.R., 1984. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J. Dairy Sci.* 67, 1293–300.
- Sobiech, P., Kuleta, Z., 2002. Usefulness of some biochemical indicators in detection of early stages of nutritional muscular dystrophy in lambs. *Small Rumin. Res.* 45, 209–215.
- Spears, J.W., 2003. Comparative Trace Element Nutrition. *J. Nutr.* 1506S–1509S.
- Stefanowicz, F.A., Talwar, D., O'Reilly, D.S.J., Dickinson, N., Atkinson, J., Hursthouse, A.S., Rankin, J., Duncan, A., 2013. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. *Clin. Nutr.* 32, 837–842.
- Stowe, H.D., Herdt, T.H., 1992. Clinical Assessment of Selenium Status of Livestock. *J. Anim. Sci.* 70, 3928–3933.
- Suleyman, K., Gunduz, H., Yeter, D., Nihat, M., I.Hakki, Y., Tevhide, S., 2007. Studies on serum tocopherol, selenium levels and catalase activities in lambs with white muscle disease. *Bull Vet Pulawy* 51, 281–284.
- Tapiero, H., Townsend, D., Tew, K., 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed. Pharmacother.* 57, 134–144.
- Tekeli, H., Kiral, F., Bildik, A., Yilmaz, M., Kaçamakli, Z., 2015. Effect of aging on enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in saanen goats. *Vet. ir Zootech.* 71, 67–71.
- Van Ryssen, J.B.J., Coertze, R.J., Smith, M.F., 2013. Time-dependent effect of selenium supplementation on the relationship between selenium concentrations in whole blood and plasma of sheep. *Small Rumin. Res.* 112, 85–90.
- Vandamme, T.F., Ellis, K.J., 2004. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1415–36.
- Whanger, P.D., Weswing, P.H., Oldfield, J.E., 1978. Selenium , Sulfur and Nitrogen Levels in Ovine Rumen Microorganisms. *J. Anim. Sci.* 46, 515–519.
- Wichtel, J.J., Thompson, K.G., Craigie, A.L., Williamson, N.B., 1996. Short-term

alteration in voluntary feed intake after selenium supplementation in Angora goat kids. *New Zeal. J. Agric. Res.* 39, 107–110.

Zoidis, E., Pappas, A.C., Georgiou, C.A., Komaitis, Feggeros, K., 2010. Selenium affects the expression of GPx4 and catalase in the liver of chicken. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 155, 294–300.