



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN.**

**“Respuesta serológica a diferentes
antígenos de *Mannheimia haemolytica* en conejos
(*Oryctolagus cuniculus*) suplementados
con vitamina E y selenio.”**

T E S I S

Para obtener el título de:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA.

Presenta:

CIRIACO SOLANO LINA ELIZABETH.

Asesor:

DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ.

Coasesor:

DR. VÍCTOR MANUEL DÍAZ SÁNCHEZ.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO; 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Respuesta serológica a diferentes antígenos de Mannheimia haemolytica en conejos (Oryctolagus cuniculus) suplementados con vitamina E y selenio.

Que presenta la pasante: LINA ELIZABETH CIRIACO SOLANO

Con número de cuenta: 31009325-5 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Junio de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Javier Froylan Lazcano Reyes	
VOCAL	Dr. José Francisco Morales Álvarez	
SECRETARIO	Dra. Cynthia González Ruiz	
1er. SUPLENTE	M. en C. Elisa Gutiérrez Hernández	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Víctor David González Fernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS.

A mi amada familia quien me ha cuidado, ayudado y educado a lo largo de este camino para cumplir mis metas.

A mis padres Carmelita Solano y J. Gilberto G. Ciriaco, ya que sin ellos esto no hubiera sido posible, por haberme inculcado la importancia de una formación académica, además de darme su apoyo y tiempo para lograr culminar mi carrera

A mi abuela Agripina Solano por su apoyo, su cariño, quien me impulsó a este camino, me dio su tiempo, la cual me enseñó el respeto y cuidado hacia los animales. *Luceat Lumen est*

A Tere y María Ambriz, por sus cuidados y enseñanzas, espero contar con su apoyo siempre.

Y especialmente a mi amado hijo Vladimir S. Rincón, quien me ha dado sus sonrisas, su cariño y me ha acompañado todo este tiempo, espero lo impulse para cumplir sus propósitos.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres Carmelita Solano y J. Gilberto G. Ciriaco quienes me han guiado y educado con paciencia y esfuerzo. Gracias por apoyarme y acompañarme. A César Rincón por estar a mi lado, espero nunca te rindas.

A mis profesores el Dr. Francisco Morales y el Dr. Víctor Díaz, los cuales me han dado su confianza, su apoyo a lo largo de este proyecto y en mi formación profesional. Gracias por su paciencia.

A la Dra. Gabriela Rodríguez, la Dra. Ma. Guadalupe Martínez y la Dra. Fabiola Pineda por asesorarme, darse el tiempo de resolver mis dudas y brindarme su valiosa ayuda para poder culminar este proyecto. Gracias por sus consejos y su amistad.

A mis queridos amigos Carmen Buendía, Nayely Ortiz, Cristina Pérez, Liliana Pérez, Alejandro Ortiz, Fabian Salazar, Ángel Colin, Mario Viazcan, Diana Quiroga, Jocelyn Hernández, Manu Manuel, con quienes he pasado buenos momentos, me han hecho esta experiencia más amena, además de haberme brindado su apoyo y consejos, en especial a José M. Meza, Ana Rodríguez, Sara Chávez Y Patricia Loman, por su ayuda brindada en este proyecto, darme palabras de aliento y por las buenas experiencias juntos. Gracias por su amistad.

Y a todas las personas que estuvieron involucrados directa o indirectamente a lo largo de mi formación profesional, profesores, amigos, colegas y compañeros de trabajo. Gracias por estar ahí.

ÍNDICE.

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cunicultura en México.....	1
1.1.1. El conejo como modelo experimental.....	1
1.2. Micronutrientes antioxidantes.....	1
1.2.1. Antioxidantes enzimáticos.....	2
1.2.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	3
1.3. Vitamina E.....	5
1.3.1. La vitamina E y su papel en el sistema inmune.....	6
1.4. Selenio.....	6
1.5. Deficiencia de selenio en México.....	7
1.6. Selenio como suplemento alimenticio.....	8
1.7. Metabolismo del selenio.....	9
1.7.1. Absorción.....	9
1.7.2. Distribución.....	10
1.7.3. Excreción.....	11
1.8. Selenoproteínas.....	11
1.8.1. El grupo glutatión peroxidasa (GSH-Px).....	13
1.9. El selenio y su papel en el sistema inmune.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
4. HIPÓTESIS.....	16
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17

5.1.	Localización del lugar de experimentación.....	18
5.2.	Características y mantenimiento del modelo biológico.....	18
5.3.	Distribución de los grupos experimentales.....	18
5.4.	Descripción de los tratamientos inoculados.	19
5.5.	Tratamientos aplicados a los grupos experimentales y toma de muestras. 19	
5.6.	Obtención de antígenos para las pruebas de ELISA.	22
5.6.1.	Sonicado de <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2.....	22
5.6.2.	Obtención de la leucotoxina de <i>Mannheimia haemolytica</i>	24
5.7.	Métodos analíticos.	27
5.7.1.	Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA indirecta).....	27
5.7.2.	Cuantificación de selenio.	28
5.7.3.	Digestión ácida.	28
5.7.4.	Espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros.	30
6.	RESULTADOS.	31
6.1.	Cuantificación de selenio en plasma en los grupos experimentales.	31
6.2.	Evaluación de la respuesta antigénica a <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2 en suero de los grupos experimentales.	34
6.3.	Evaluación de la respuesta antigénica a la Leucotoxina de <i>Mannheimia haemolytica</i> en suero de los grupos experimentales.	36
7.	DISCUSIÓN.....	40
8.	CONCLUSIÓN.....	47
9.	LITERATURA CITADA.	48

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Función y ubicación de los antioxidantes enzimáticos..	3
Tabla 2. Función de los antioxidantes no enzimáticos..	4
Tabla 3. Principales selenoproteínas y su función.	12
Tabla 4. Cronograma semanal de actividades.	19
Tabla 5. Identificación, peso y dosis de selenio del Grupo A.	20
Tabla 6. Identificación, tercer pesaje y dosis de selenio del Grupo A.	22
Tabla 7. Análisis de varianza de la cuantificación de selenio en plasma de los grupos experimentales y el grupo control.....	31
Tabla 8. Análisis de varianza de las absorbancias para el antígeno <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2 de los sueros de los grupos experimentales y del grupo control.	34
Tabla 9. Análisis de varianza de las absorbancias para la leucotoxina de <i>Mannheimia haemolytica</i> de los sueros de los grupos experimentales y el grupo control.	37

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. Para la aplicación del fármaco se realizó la asepsia de la zona (A) y se administró el selenio y la vitamina E por vía subcutánea (B).....	21
FIGURA 2. Para obtener el antígeno se hizo una suspensión de la bacteria en solución salina (A), y se colocó el tubo cónico para centrifuga en baño de hielo (B), el cual para la lisis de la bacteria se colocó el tubo falcón en el ULTRASONIC PROCESSOR (C).	23
FIGURA 3. El lisado de la bacteria se coloca microtubos para después centrifugar (A) y luego separar el sedimento del lisado de la bacteria y reconstituirlo con solución salida (B).	23
FIGURA 4. Al mezclar sangre de ovino con agua destilada (A) y al agregar PBS 2x (B) se torna color vino (C).	24
FIGURA 5. Al centrifugar se observa una capa roja y una blanca en el fondo del tubo (A) y se decantó el sobrenadante (B) para reconstituir el sedimento con RPMI (C).	25
FIGURA 6. En una microplaca de fondo plano se coloca en los pozos de la columna A leucotoxina y en los pozos de la fila B se pone RPMI para re alizar las diluciones.	25
FIGURA 7. Se observa la suspensión de células, la cual fue colocada en todos los pozos de la microplaca (A) para después colocar está en la centrifuga (B).....	26

FIGURA 8. A la microplaca se le agrega formol al 10% (A), y después de encubar se añade cristal violeta a cada pozo (B), luego se decanta y se lava la placa (C).	26
FIGURA 9. En la imagen se observa cómo se colocó el antígeno en cada pozo.	27
FIGURA 10. La microplaca se incubó a temperatura ambiente (A) y después se realiza la lectura en el espectrofotómetro (B).	28
FIGURA 11. Se observan los vasos de teflón con los reactivos (A) los cuales se cerraron y se colocaron en el carrusel (B).	29
FIGURA 12. Se coloca el carrusel dentro del horno de microondas MARS-digestión CEM (A), una vez terminado el proceso, las muestras se colocan en un matraz y se afora con ácido clorhídrico 7 M (B).	29
FIGURA 13. Se procesaron en el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros Varian® (A) para la lectura de las muestras (B).	30
FIGURA 14. Medias de la cuantificación de selenio en plasma de los grupos experimentales y del grupo control.	32
FIGURA 15. Cuantificación de selenio semanal en plasma de los grupos experimentales y del grupo control.	33
FIGURA 16. Medias de absorbancias totales de los grupos experimentales y el grupo control al antígeno <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2 en suero.	35
FIGURA 17. Absorbancias promedio semanal para el antígeno <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2 de los sueros de los grupos experimentales y del grupo control.	36
FIGURA 18. Medias de absorbancias de los grupos experimentales y del grupo control de la leucotoxina de <i>Mannheimia haemolytica</i> serotipo A2 en suero.	38
FIGURA 19. Promedio semanal de las absorbancias para la respuesta antigénica de la leucotoxina de <i>M. haemolytica</i> de los sueros de los grupos experimentales y del grupo control.	39

ABREVIATURAS.

- Se: Selenio.
- GSH-Px o GPXs: Glutación peroxidasa.
- GSH-Px1: Glutación peroxidasa hepática.
- GSH: Glutación.
- H₂O₂: Peróxido de hidrogeno.
- ROOH: Hidroperóxido.
- SOD: Superoxido dismutasa.
- CAT: Catalasa.
- TRX: Tiorredoxina reductasa.
- GRX: Glutación Reductasa.
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad.
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
- xg: gravedades.
- REDOX: Reacciones tipo oxido-reducción.

RESUMEN.

En la producción animal, los micronutrientes participan en muchas rutas metabólicas y son necesarios para mantener la integridad de aquellos tejidos de recambio rápido, por lo cual hay un creciente interés en el uso de suplementos con propiedades antioxidantes en la alimentación que protegen contra el daño oxidativo. Se conoce que con terapias de selenio (Se) y vitamina E, existe efecto sinérgico para mantener los mecanismos involucrados en la respuesta inmune. Para evaluar el efecto de la suplementación de estos antioxidantes en la respuesta inmune, se utilizó al conejo como modelo biológico para evaluar la respuesta antigénica a los antígenos de *Mannheimia haemolytica*. En este trabajo se utilizaron 21 conejos de raza Chinchilla, los cuales después de un periodo de adaptación se distribuyeron en tres grupos diferentes; el Grupo A al cual se le inoculó vitamina E y selenio, además de una bacterina toxoide, el Grupo B, al cual se le inoculó la bacterina toxoide y el Grupo C al cual solo se le administró solución salina fisiológica. Se hizo un muestreo semanal para obtener suero y plasma, las cuales fueron utilizadas para realizar un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA indirecta) para los antígenos de *M. haemolytica* serotipo A2 y la leucotoxina de *M. haemolytica*. Además, se cuantificó el selenio en plasma de todos los Grupos, utilizando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros. Se obtuvo una mayor concentración de selenio en plasma del Grupo A (promedio, 0.095 μg) en comparación con el Grupo B (promedio, 0.049 μg) y el Grupo C (promedio 0.048 μg) teniendo una diferencia estadística ($p < 0.05$). En cuanto a la evaluación de la respuesta a los antígenos se obtuvo para *M. haemolytica* serotipo A2 una diferencia estadística ($p < 0.05$), siendo el Grupo A (promedio, 1.086 nm) el que tuvo mejor respuesta a este antígeno en comparación con el Grupo B (promedio, 0.775 nm) y el Grupo C (promedio, 0.736 nm). Sin embargo, al evaluar la respuesta antigénica de la leucotoxina de *M. haemolytica*, no se obtuvo una respuesta similar, a pesar de un incremento de la respuesta al antígeno del Grupo A (promedio, 0.972 nm), no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) en comparación para el Grupo B (promedio, 0.782 nm), pero si hay diferencia estadística de ambos grupos con respecto al Grupo C (promedio, 0.407 nm). En

conclusión, se logró la suplementación de selenio y vitamina E vía subcutánea la cual tuvo efectos benéficos sobre la respuesta al antígeno de estos conejos a diferencia de los animales que no fueron suplementados, la cual se observó para *M. haemolytica* serotipo A2, pero no para la leucotoxina de *M. haemolytica*.

Palabras clave: *Mannheimia haemolytica*, leucotoxina, selenio, vitamina E, conejo, antígenos, inmunidad.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Cunicultura en México.

La cunicultura es una actividad que está creciendo a nivel mundial en los últimos tiempos, debido a su fácil manejo, la rapidez con la que se reproducen y la posibilidad de generar animales para su venta o autoconsumo (García *et al.*, 2017). Pese a estas ventajas, el progreso de la cunicultura en México ha sido limitado debido a la poca difusión de su consumo, a pesar de tener diversas ventajas con relación a otros tipos de carne, debido a la poca organización entre los productores (Olivares *et al.*, 2009; Coreno *et al.*, 2017).

1.1.1. El conejo como modelo experimental.

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*), constituye un animal de fácil crianza y mantenimiento, de bajo costo y de alta disponibilidad en nuestro medio (Hernández *et al.*, 2012). Los conejos pueden ser empleados para muchos propósitos, entre ellos en la investigación de enfermedades infecciosas e inmunológicas, por la alta calidad y cantidad de sus anticuerpos; también se usan en serología (Fuentes *et al.*, 2010).

1.2. Micronutrientes antioxidantes.

En la producción animal, los micronutrientes (vitaminas y minerales) participan en muchas rutas metabólicas, así como en la diferenciación, replicación, regulación y modulación de los procesos celulares. Estos son necesarios para mantener la integridad de aquellos tejidos de recambio rápido e importantes en la respuesta inmune de los animales (Campos, 2015).

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de donar electrones o átomos de hidrógeno, para transformar las especies reactivas de oxígeno o

radicales libres, en compuestos mucho más estables, regulando su cantidad en el organismo, para que de esta forma protejan a la célula del daño oxidativo (Candia *et al.*, 2015; Rodríguez, 2013).

Hay un creciente interés en el uso de suplementos con propiedades antioxidantes en la alimentación animal que protegen contra el daño oxidativo. Algunos antioxidantes no pueden ser sintetizados por el organismo y por lo tanto deben ser tomados en la dieta (antioxidantes exógenos), por ejemplo, el acetato de α -tocoferol (la fuente de vitamina E más ampliamente disponible para la suplementación), carotenoides y los metales traza como el selenio (Se), el manganeso (Mn) y el zinc (Zn). De forma general hay dos mecanismos fundamentales: los antioxidantes enzimáticos y los antioxidantes no enzimáticos (Abdel Khalek, 2013; De la Cruz *et al.*, 2008).

1.2.1. Antioxidantes enzimáticos.

Los antioxidantes enzimáticos se componen un sistema de defensa basado en un complejo enzimático, donde se encuentran enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peróxidasa (GSH-Px), la tiorredoxina reductasa (TRX) y la glutatión reductasa (GRX). Dentro de estos antioxidantes es importante destacar a ciertos oligoelementos, cuya incorporación al organismo es necesaria por constituir parte del sitio activo de las enzimas antioxidantes.

Estos oligoelementos son cobre (Cu), zinc (Zn), selenio (Se), magnesio (Mg) y hierro (Fe); por ejemplo, las expresiones de la glutatión peroxidasa y la tiorredoxina reductasa, dependen de que se cuente con cantidades adecuadas de selenio, las expresiones del superóxido dismutasa dependen de un aporte adecuado de Cu y Zn; la actividad del glutatión reductasa depende de un consumo suficiente de riboflavina (De la Cruz *et al.*, 2008; Mayor, 2010; Zamora, 2007). En la **Tabla 1** se observan algunos antioxidantes enzimáticos, su función fisiológica y la ubicación donde realizan su función.

Tabla 1. Función y ubicación de los antioxidantes enzimáticos. Modificado de (Rodríguez, 2013; Zamora, 2007).

ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO.	LOCALIZACIÓN.	FUNCIÓN FISIOLÓGICA.
SUPERÓXIDO DISMUTASA.	Citoplasma y mitocondria.	Metaloenzima dependiente de Zn, Cu. Convierte el O ₂ ⁻ a peróxido de hidrógeno (Dismuta radicales superóxido).
GLUTATIÓN PEROXIDASA.	Citoplasma y mitocondria.	Selenoenzima su actividad depende de la presencia de glutatión reducido como donador de hidrógeno. Elimina el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos.
CATALASA.	Citoplasma y mitocondria.	Descompone a los hidroperóxidos en agua más una molécula de oxígeno (Elimina peróxido de hidrógeno).
GLUTATIÓN REDUCTASA.		Reduce glutatión oxidado a glutatión reducido.

1.2.2. Antioxidantes no enzimáticos.

El sistema de antioxidantes no enzimáticos o exógenos, están determinados por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, los cuales intervienen retrasando la producción y acción de los radicales libres (López *et al.*, 2012).

Algunos antioxidantes no enzimáticos en las células son el glutatión, el ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinosas, los bioflavonoides, las vitaminas A, E y C (Zamora, 2007). En la **Tabla 2** se muestran algunos antioxidantes no enzimáticos, y su función fisiológica.

Tabla 2. Función de los antioxidantes no enzimáticos. Modificado de (Mayor, 2010; Rodríguez, 2013; Zamora, 2007).

ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS.	FUNCIÓN FISIOLÓGICA.
VITAMINA E (A-TOCOFEROL).	Principal antioxidante presente en la membrana celular. Destruye las especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, bloqueador de la cadena de lipoperoxidación en la fase de propagación. Neutraliza el oxígeno singulete. Captura radicales hidroxilo. Captura anión superóxido. Neutraliza peróxidos.
VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO).	Efecto eliminador de radicales, reacciona con especies reactivas de oxígeno. También previene la nitración de moléculas y recicla la vitamina E regenerando la forma oxidada de la vitamina.
ÁCIDO ÚRICO.	Su efecto es eliminar el radical hidroxilo.
GLUTATIÓN.	Tiene varios efectos en la defensa antioxidante celular.
ÁCIDO LIPOICO.	Antioxidante eficaz, y es un sustituto eficaz del glutatión.
CAROTENOIDES.	Antioxidante de lípidos.
BILIRRUBINA.	Producto del metabolismo del grupo hem de la hemoglobina y tiene un efecto antioxidante a nivel extracelular.
UBIQUINONAS.	Derivado de quinonas lipídicas solubles, cuyas formas reducidas tienen efectos eficaces como antioxidantes.

1.3. Vitamina E.

La vitamina E es un compuesto liposoluble dentro del grupo de los tocoferoles, en sus formas alfa, beta, gamma, y delta tocoferoles y como tocotrienoles. Todos los compuestos a base de vitamina E se diferencian entre sí, por su absorción y contenido de dicha vitamina (Apaza, 2014; Molina *et al.*, 2014). Las formas comerciales de vitamina E α -tocoferol natural y el α -tocoferol sintético, o bien una mezcla de ambos. Los diferentes complejos de vitamina E tienen distinta biodisponibilidad, son transportados en el plasma por las lipoproteínas HDL (lipoproteínas de alta densidad, *high density lipoproteins*) y LDL (lipoproteínas de baja densidad, *low density lipoproteins*) formando complejos con ellas y protegiendo de esta manera la peroxidación por parte de los radicales libres (Berg, 2010). De esta forma el α -tocoferol es la forma más activa, absorbiéndose en el intestino delgado, transportado por las lipoproteínas del plasma y hematíes para luego ser depositada en el hígado, tejido adiposo y músculo (Apaza, 2014).

La vitamina E es esencial para funciones corporales como: el crecimiento, respuesta inmune, integridad de los tejidos, reproducción, prevención de enfermedades y la función antioxidante (Ebeid *et al.*, 2013). También protege las membranas celulares contra el daño oxidativo, manteniendo la integridad de los fosfolípidos de la membrana celular protegiéndolos de la peroxidación, neutralizando los radicales libres y previniendo la oxidación de los lípidos dentro de las membranas (Abdel Khalek, 2013; Fraire *et al.*, 2013).

En plasma y eritrocitos, es el principal antioxidante liposoluble que protege los lípidos contra el daño oxidativo. El contenido de esta vitamina determina la susceptibilidad al daño por agentes oxidantes tales como son los radicales hidroxilos, alcoxilo, peroxilo, el oxígeno singlete y quizás a varios complejos de metales unidos al oxígeno en los microsomas, hepatocitos u órganos enteros. La reactividad de la vitamina E con los radicales orgánicos peroxilos se asocia con las propiedades redox del anillo cromado y es la responsable de su capacidad antioxidante (Febles *et al.*, 2002).

1.3.1. La vitamina E y su papel en el sistema inmune.

Las bajas concentraciones de vitamina E se asocian con la desestabilización de las membranas celulares, disminución de la hipersensibilidad retardada, producción de inmunoglobulinas, disminución de la inmunidad celular y la producción de interleucina-2 (IL-2). La suplementación con esta vitamina mejora la proliferación de los linfocitos y la producción de IL-2, mejora la actividad citotóxica de las células NK y aumenta la actividad fagocítica por los macrófagos alveolares causando un aumento de la resistencia contra agentes infecciosos (Febles *et al.*, 2002; Seguro *et al.*, 2016), además se conoce que con terapias de selenio y vitamina E, existe efecto sinérgico sobre la producción de anticuerpos. (Rodríguez, 2013).

1.4. Selenio.

El selenio (Se), es un metaloide, con el número atómico 34, su nombre proviene del griego *selene*, que significa luna. Este elemento fue descubierto por el químico sueco Jöns Jakob Berzelius en 1817 (Villanueva, 2011). Se puede encontrar de forma inorgánica como selenito o selenato, u orgánica en forma de selenoaminoácidos tales como selenocisteína y selenometionina, es un micromineral que se encuentra distribuido de forma variable en la corteza terrestre, encontrándose como selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selenio elemental (Se^0), y selenuro (Se^{-2}), también combinado con elementos pesados y en menor proporción como elemento libre asociado con azufre e hidrógeno (Molina *et al.*, 2014; Velázquez, 2015; Vinchira *et al.*, 2010).

Es un elemento traza el cual es considerado un micronutriente esencial para los mamíferos (Manzanares, 2007), siendo un elemento necesario para los procesos de crecimiento y reproducción de los animales (Ebeid *et al.*, 2012). Se identificó que el selenio es esencial para la salud animal pues descubrieron que pequeñas cantidades protegen contra la necrosis hepática en ratones deficientes de vitamina E (Velázquez, 2015).

El selenio es indispensable para el funcionamiento normal del sistema inmune, músculos, corazón, hígado, riñones, páncreas, testículos, plasma, glóbulos rojos y otros órganos como la tiroides. La función más importante del selenio es como antioxidante, actúa en el espacio extracelular, en el citoplasma, en asociación con las membranas celulares y específicamente en el tubo digestivo colabora en la absorción de lípidos y tocoferoles, a través de la lipasa pancreática. También actúa, por su alta actividad química, como un removedor de los metales pesados como cadmio (Cd), mercurio (Hg), aluminio (Al), Arsénico (As), plata (Ag) y plomo (Pb) del organismo animal (Molina *et al.*, 2014; Villanueva, 2011).

1.5. Deficiencia de selenio en México.

Existen zonas a nivel en el mundo donde hay una abundancia o bien una deficiencia de selenio (Villanueva, 2011). En México los estudios señalan al norte del país con cantidades altas de selenio y del altiplano hacia las costas como seleno-deficientes (Molina *et al.*, 2014).

Sin embargo, en suelos con adecuados niveles de selenio, la presencia de otros minerales como calcio (Ca), azufre (S), cobre (Cu) y arsénico (As), pueden interferir su incorporación por la planta y la presencia en la dieta de estos mismos elementos o de grasas polinsaturadas y nitratos, reducen su absorción en el intestino delgado (Elghany, 2007).

La mayor parte del territorio mexicano es de origen volcánico, por lo que las concentraciones de este mineral son menores a 0.1 ppm, éste es un problema endémico desde el altiplano hasta el sur de México, por lo tanto, los alimentos que se producen en esta región son pobres en selenio, ya que el contenido de selenio de las plantas varía considerablemente de acuerdo con su concentración en el suelo (Carbajal *et al.*, 2013; Ramírez, 2009; Tapiero *et al.*, 2003), ocasionando concentraciones inadecuadas para mantener las funciones fisiológicas en los

animales. Esta deficiencia puede prevenirse administrando selenio a través de mezclas minerales, soluciones inyectables de selenito de sodio, soluciones vía oral, bolos intrarruminales, en el agua o suplemento mineral a libre acceso (López *et al.*, 2012).

1.6. Selenio como suplemento alimenticio.

Las concentraciones de selenio en los diferentes alimentos varían de acuerdo con factores como la localización geográfica, las características del suelo, los cambios climáticos o el contenido de proteína del alimento y el procesamiento de éste (Vinchira *et al.*, 2010).

La suplementación de los animales puede realizarse incorporando el elemento en la dieta o utilizando otras vías de administración como se mencionó anteriormente. La elección de la forma de suplementación dependerá de las condiciones productivas y la consecuente facilidad para su utilización (Elghay, 2007).

La adición de selenio en las dietas varía de acuerdo con la especie, en pavos es de 0.10 mg/kg; en ovinos de 0.30–0.45 mg/kg; conejos de 0.05–0.70 y cerdos 0.45 mg/kg. Dicha suplementación se puede realizar de dos formas: inorgánica y orgánica (Velázquez, 2015).

El selenito de sodio y selenato de sodio (fuentes inorgánicas) han sido utilizadas en premezclas vitamínicas, mezclas proteicas en animales. La preparación de estos compuestos busca obtener fuentes alternativas del mineral (Vinchira *et al.*, 2010). La forma química afecta la absorción de selenio, el selenito de sodio administrado por vía subcutánea es más rápidamente absorbido que el selenito de bario (Elghany, 2007).

1.7. Metabolismo del selenio.

El selenio es adquirido principalmente a través de la dieta en formas orgánicas (como seleno-L-metionina, seleno-L-cisteína, seleno-L-cisteína, selenocisteína) o inorgánicas (por ejemplo, selenito, selenato) (Rahmanto *et al.*, 2012; Davies, 2012). Debido a que las seleno moléculas son metabolizadas por vías específicas de la especie, el beneficio fisiológico del consumo de selenio a un animal depende en parte de las formas químicas que se consumen (Finley, 2005).

1.7.1. Absorción.

La selenometionina es la forma predominante en la mayoría de las dietas (Rahmanto *et al.*, 2012), cuando es ingerida se absorbe en el intestino delgado a través del sistema de transporte neutro de aminoácidos dependiente de Na⁺. Por otro lado, la selenometionina puede seguir la vía de transulfuración, se convierte en selenocisteína y luego puede ser entonces escindida por una liasa específica, formando seleniuro. En la otra vía, se puede usar seleniuro para formar selenocisteína, que se inserta en selenoproteínas, donde el potencial redox del selenio permite catalizar múltiples reacciones del metabolismo. Los animales son incapaces de sintetizar selenometionina y sólo se detectó selenocisteína en ratas suplementadas con selenio como selenito (Finley, 2005; Tapiero *et al.*, 2003).

En cuanto al selenio inorgánico, solo se incorpora dentro de un aminoácido en específico que es la cisteína para posteriormente convertirse en selenocisteína y poder insertarse de esta forma dentro de las selenoproteínas, mientras que la selenometionina puede ser incorporada de forma inespecífica en cualquier proteína (López *et al.*, 2012).

Por ejemplo, cuando es administrado el selenio en forma de selenato, se absorbe principalmente en el duodeno, entra al organismo, el cual es reducido a selenofosfato, precursor universal de la selenocisteína; a diferencia de la selenometionina la cual es una fuente orgánica de selenio la cual tiene menos

disponibilidad metabólica para generar selenocisteína, por lo que se une a las proteínas del plasma y es llevado por la corriente sanguínea al hígado y al bazo, en donde es reducido a selenio, por la glucosa que se encarga de llevarla a todos los tejidos excepto a los grasos. (Elghany, 2007, Villanueva, 2011).

1.7.2. Distribución.

Después del proceso de absorción, el selenio puede incorporarse a aminoácidos como: cistina, cisteína y metionina, dando lugar a especies orgánicas como selenocistina, selenocisteína, selenometionina, metil-selenocisteína y selenometil-selenocisteína; siendo la selenocisteína la forma en que el selenio se encuentra en las selenoproteínas, las cuales contienen uno o varios átomos de selenio que reemplaza el azufre (Velázquez, 2015).

El selenio plasmático es transportado en un 60-70% en la selenoproteína P (SePP), 30% en el glutatión peroxidasa (GSH-Px) y 10% ligado a la albúmina y lipoproteínas de baja y muy baja densidad; el mineral ingresa a los tejidos en forma de seleno metionina y selenocistina, en el caso de tejidos animales (Vinchira *et al.*, 2010).

La expresión de las selenoproteínas es regulada homeostáticamente, por ejemplo, si las concentraciones de selenio en el organismo son bajas en algunos casos este mineral se acumula, también cuando la selenometionina es consumida o sustituye aleatoriamente a la metionina, el selenio se acumulará en grandes masas de proteínas (por ejemplo, en la albúmina en plasma) (Finley, 2005). Se reconocen dos reservas corporales de selenio presentes en humanos y animales, estas son: el selenio presente en forma de selenometionina y el que se encuentra en forma de GSH-Px1 hepática (Vinchira *et al.*, 2010).

1.7.3. Excreción.

Una vez asimilado por en el organismo, el selenio que no es retenido puede ser metabolizado mediante la vía de metilación, es excretada por medio de la orina, también se puede eliminar también por medio de la respiración en forma metilada (dimetil-selenol) o en las heces la cual está relacionada con la dosis administrada y la vía de administración; la segunda es influenciada por la cantidad de selenio presente en el animal. Los metabolitos excretados en la orina se presentan en forma monometilada y trimetilada, cuya proporción varía de acuerdo con la cantidad de selenio presente; en bajas cantidades es excretado en forma monometilada, mientras que con altas concentraciones se elimina de las dos formas, principalmente la trimetilada. (Finley, 2005; Vinchira *et al.*, 2010; López *et al.* 2012).

1.8. Selenoproteínas.

El selenio orgánico e inorgánico se incorpora como selenocisteína a las selenoproteínas, este aminoácido está completamente ionizado a pH fisiológico y actúa como un catalizador redox muy eficiente (Beckett *et al.*, 2005), éste también es el componente estructural central de un número específico de enzimas, haciéndolo un elemento traza esencial para animales y humanos (Velázquez, 2015), en cuanto al selenio orgánico en forma de selenometionina, se incorpora en proteínas generales por el mismo codón que la metionina, de modo que su biodisponibilidad es mayor (Ebeid *et al.*, 2012). Estas acciones biológicas están mediadas en la mayoría de los casos mediante la expresión de al menos 30 selenoproteínas codificadas a través de 25 genes de selenoproteína (Beckett *et al.*, 2005).

Aproximadamente, la mitad de las selenoproteínas caracterizadas se han asociado a tener funciones antioxidantes. Por lo tanto, el aumento de los riesgos de enfermedades con la deficiencia de selenio puede atribuirse al aumento del estrés oxidativo y alteraciones en la señalización redox (Tapiero *et al.*, 2003). De las 30

selenoproteínas que se han caracterizado e identificado bioinformáticamente, seis son GPXs, tres son la iodotironina desiodinasas y tres son tiorredoxina reductasa. La selenoproteína P es cuantitativamente la selenoproteína principal en el plasma y tiene papeles tanto antioxidantes como de transporte (Beckett *et al.*, 2005). En la **Tabla 3** se observan las principales selenoproteínas y una descripción de sus funciones.

Tabla 3. Principales selenoproteínas y su función. Modificado de (Stoytcheva *et al.*, 2009; Kasaikina *et al.* 2012; Grundner *et al.*, 2001; Rodríguez, 2013).

SELENOPROTEÍNAS.	FUNCIONES.
GSH-PX1 (CITOSOLICA). GSH-PX2 (GASTROINTESTINAL). GSH-PX3 (PLASMÁTICA). GSH-PX4 (HIDROPEROXIDASA FOSFOLIPIDO). GSH-PX6 (OLFATO). GSH-PX5. GSH-PX7.	Eliminan hidroperóxidos.
SELENOPROTEÍNAS DE LA CÁPSULA MITOCONDRIAL DEL ESPERMA.	Protege el desarrollo de las células espermáticas de daño oxidativo.
IODOTIRONINA-DESIODINASA. TIPO I (PLASMA, MEMBRANA), TIPO II (RETÍCULO ENDOPLASMICO), TIPO III (PLASMA, MEMBRANA).	Producción y regulación de la conversión de T3 a partir de T4.
TIOREDOXINA-REDUCTASA 1(CITOSOL),2(MITOCONDRIA),3.	Control redox de grupos tioles.
SELENOFOSFATO-SINTETASA SPS2.	Síntesis del selenofosfato. Precursor de la selenocisteína.
SELENOPROTEÍNA P.	Proteína de transporte y protege las células endoteliales frente al ataque de peroxinitritos.
SELENOPROTEÍNA S.	Producción de citoquinas.
SELENOPROTEÍNA K.	Modula Ca ²⁺ en la afluencia de la función inmune celular.

1.8.1. El grupo glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Una de las funciones más ampliamente reconocidas del selenio es que actúa como cofactor de la enzima GSH-Px, de esta proteína se pueden encontrar las isoenzimas GSHPx1, GSH-Px2, GSH-Px3, GSH-Px4, que se localizan en eritrocitos, tracto gastrointestinal, de forma extracelular e intracelular, respectivamente (Müller *et al.*, 2002; Vinchira *et al.*, 2010).

El papel fisiológico principal de GSH-Px es mantener niveles adecuadamente bajos de peróxidos dentro de la célula, disminuyendo así el posible daño de los radicales libres. Proporciona una segunda línea de defensa contra los hidroperóxidos que pueden dañar las membranas y otras estructuras celulares. La GSH-Px actúa sinérgicamente con tocoferol en la regulación de la peroxidación de lípidos. En conjunto con la catalasa (CAT), degrada el peróxido de hidrógeno a agua, a través de la glutatión reductasa (GRX) y flavina adenina deshidrogenasa (FAD) en la pentosa fosfato (Tapiero *et al.*, 2003). Los alcances de las funciones biológicas de las GPxs también comprenden la desintoxicación de hidroperóxidos, la inhibición de la apoptosis y procesos inflamatorios, la modulación de las cascadas de señalización, la detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para la activación de factores de transcripción y el uso de ROOH (Hidroperoxido) para la síntesis de proteínas estructurales (Velázquez, 2015).

La actividad biológica del selenio se logra mediante el mantenimiento de la actividad de las diferentes glutatión peroxidases:

- GPxl = glutatión peroxidasa celular, es una enzima citosólica expresada en todos los tipos de células y se cree que es una de las principales proteínas antioxidantes en los mamíferos. Es la selenoproteína más abundante en mamíferos y su actividad está regulada en el hígado por el estado de Se.

- GPx2 = glutatión peroxidasa gastrointestinal, es el homólogo más cercano de GSH-Px1, pero se encuentra predominantemente en el tracto gastrointestinal.
- La GSH-Px3 es la segunda selenoproteína más abundante en el plasma después de selenoproteína P (Se-P).
- GPx4 = también se llama hidroperóxido fosfolípido glutatión peroxidasa, ya que reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos específicamente esterificados a fosfolípidos. Se ha localizado tanto en el citosol como en las mitocondrias (Müller *et al.*, 2002; Tapiero *et al.*, 2003).

Cuando estos peróxidos no son destruidos por medio de la GSH-Px se producen alteraciones en las membranas celulares, principalmente el rompimiento de membrana que compromete la integridad funcional de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, con lo cual hacen que las rutas metabólicas (glucólisis, ciclo de Krebs y cadena de transporte de electrones) se perturben fácilmente y ocurran gran cantidad de disturbios bioquímicos cuya consecuencia final será la incapacidad del animal para mantener la función reproductiva, entre otros procesos (Molina *et al.*, 2014).

Existe una relación sinérgica entre el selenio y la vitamina E para proteger contra el daño celular por especies de oxígeno reactivo. Los estudios informaron que la suplementación combinada de vitamina E y selenio aumentaron significativamente la actividad de GSH-Px. Por otra parte, han demostrado que la administración de ambos puede resultar en el aumento sinérgico de la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades (Ebeid *et al.*, 2013).

1.9. El selenio y su papel en el sistema inmune.

Las relaciones conocidas entre el selenio y la función inmune incluyen la efectividad de las células fagocitarias; esta relación es importante para mantener los mecanismos involucrados en la citotoxicidad y la producción de anticuerpos (Elghany, 2007).

La disminución de la eficacia del sistema inmune asociada con el envejecimiento, se ha demostrado que las células acumulan daño oxidativo provocando un envejecimiento o deterioro por lo que el daño tanto mitocondrial como nuclear ocurre (Tapiero *et al.*, 2003), por ejemplo, en algunos experimentos han demostrado que animales deficientes de selenio presentan una depleción de la cantidad de linfocitos B, más que una simple reducción de anticuerpos producidos por aquellas células (Rodríguez, 2013).

En animales, la deficiencia de selenio afecta la capacidad de los neutrófilos fagocíticos y macrófagos para destruir los antígenos. Presumiblemente la baja actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), localizada en los lisosomas de los macrófagos, reduce la vida media de estos y un déficit nutricional de selenio resulta en la declinación de la actividad de la GSHPx, afectando los fenómenos de presentación antigénica y las respuestas humorales, con menor concentración de inmunoglobulinas (Manzanares, 2007; Rodríguez, 2013; Tapiero *et al.*, 2003), por lo que, provoca una disminución en los niveles de producción de las inmunoglobulinas IgM e IgG, dificulta la quimiotaxis de los neutrófilos, la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos y la función de las células T, factores que determinan mayor prevalencia y severidad de las enfermedades usualmente presentes en las poblaciones animales (Seguro *et al.*, 2016). Los niveles de selenio en plasma han sido positivamente correlacionados con los recuentos de células CD4+ y CD8+ favoreciendo la respuesta inmunológica (Tapiero *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICACIÓN.

La suplementación con vitamina E y selenio juega un papel importante en la respuesta inmune en diferentes especies animales, sin embargo, la información de éste, a nivel mundial es escasa. México es un país con deficiencias de selenio, por lo que han surgido algunos estudios sobre el beneficio que tiene el suplementar estos antioxidantes en la respuesta inmunológica; por esta razón, ha surgido la necesidad de adaptar un modelo biológico para estudiar este efecto. En este caso se ha optado por el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), para observar el efecto de la suplementación de selenio sobre la respuesta humoral, permitiendo una mejor evaluación de la respuesta a antígenos de *Mannheimia haemolytica*.

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar mediante una técnica inmunoenzimática la respuesta a diferentes antígenos de *Mannheimia haemolytica* en conejos vacunados, con y sin la suplementación de vitamina E y selenio.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

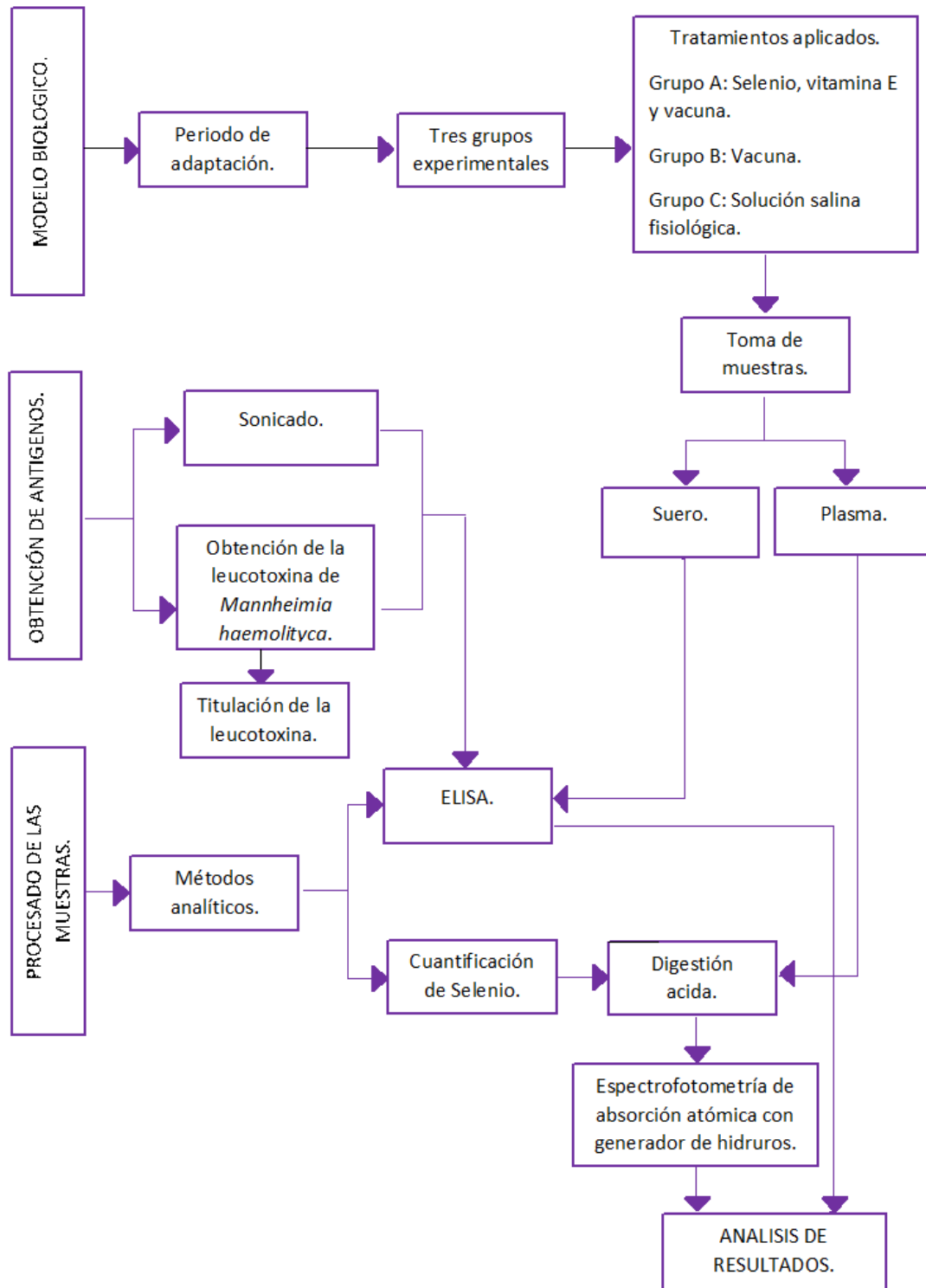
1. Evaluar la respuesta a los antígenos de *Mannheimia haemolytica* obtenidos por sonicación a través de una técnica inmunoenzimática.
2. Obtener antígenos somáticos de *Mannheimia haemolytica* por medio de sonicación.
3. Medir los niveles de selenio en plasma para evaluar la suplementación con selenito de sodio.

4. HIPÓTESIS.

Al ser el selenio un elemento que la estimula la respuesta inmune en diferentes especies de animales, si se suplementa a conejos con selenio y vitamina E, estos tendrán una mayor respuesta a antígenos de *Mannheimia haemolytica*, en comparación a los que no fueron suplementados.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

Diagrama de flujo del desarrollo experimental.



5.1. Localización del lugar de experimentación.

Los animales fueron obtenidos en el módulo cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, de la Universidad Nacional Autónoma de México, los cuales se trasladaron al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal (CENID) que se localiza en el km 15.5 de la carretera Federal México Toluca, Col. Palo Alto, Ciudad de México.

5.2. Características y mantenimiento del modelo biológico.

Se adquirieron 21 conejos, 7 hembras y 14 machos, raza Chinchilla, con un peso promedio de 1.2 Kg, a los cuales se les identificó con un número en las orejas. Los conejos fueron alojados en jaulas de acero inoxidable mantenidos con alimento comercial (pellets de alfalfa) y agua *ad libitum*, donde permanecieron durante dos semanas en un periodo de adaptación.

5.3. Distribución de los grupos experimentales.

Al terminar el periodo de adaptación los 21 conejos fueron pesados, sexados y se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos, asignándole a cada grupo un tratamiento:

- Grupo A: Compuesto por 7 conejos a los cuales se les administró una solución inyectable de vitamina E y selenito de sodio y una bacteria-toxoide para prevenir las neumonías en rumiantes, el cual fue el antígeno de evaluación.
- Grupo B: Compuesto por 7 conejos a los cuales solo se les administró una bacteria toxoide para prevenir neumonías en rumiantes.
- Grupo C: Compuesto por 7 conejos a los cuales se les administró, solución salina fisiológica y fue considerado un grupo control.

5.4. Descripción de los tratamientos inoculados.

Bacterina- toxoide: El biológico contiene una suspensión bacteriana de 1×10^6 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) a base de *Pasteurella multocida* tipo A, *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 y A2, enriquecida con Leucotoxoide de *M. haemolytica*.

Selenio y vitamina E: Solución inyectable que contiene 10.95 mg de selenito de sodio y 60 mg de vitamina E por cada mL.

5.5. Tratamientos aplicados a los grupos experimentales y toma de muestras.

Para la aplicación de los tratamientos se estableció un cronograma de actividades que se puede ver en la **Tabla 4**:

Tabla 4. Cronograma semanal de actividades.

ACTIVIDADES		SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6
PERIODO DE ADAPTACIÓN (2 SEMANAS).	GRUPOS A B C						
APLICACIÓN DE VIT. E Y SELENIO.		GRUPO A		GRUPO A			
ADMINISTRACIÓN DE BACTERINA-TOXOIDE (VACUNA).			GRUPOS A B		GRUPOS A B		
APLICACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA.			GRUPO C		GRUPO C		
MUESTREO.			GRUPOS A B C	GRUPOS A B C	GRUPOS A B C	GRUPOS A B C	GRUPOS A B C

Al terminar el periodo de adaptación, los conejos del Grupo A, fueron pesados individualmente con una báscula electrónica con capacidad de 70 Kg, y se calculó el peso metabólico de cada conejo utilizando la siguiente fórmula:

$$PM = (PV)^{0.75}$$

Donde:

PM = Peso metabólico. PV = Peso vivo del animal.

Al tener el peso metabólico se calculó los mililitros del fármaco (selenito de sodio) que se le aplicaron a cada conejo, utilizando una dosis de 0.25 mg/Kg usada en borregos (Ramírez, 2009) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$A = \frac{PM \times C}{D}$$

Donde:

A = Mililitros que se van a administrar del fármaco.

PM = Peso metabólico del animal.

C = Dosis: 0.25 mg/Kg.

D = Concentración de selenio en el producto comercial (mg/ml).

Lo que se aplicó a cada conejo del Grupo A se puede ver en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Identificación, peso y dosis de selenio del Grupo A.

NÚMERO DE ANIMAL.	PESO (Kg).	PESO METABÓLICO.	DOSIS DE SELENIO (mg).	DOSIS DE SELENIO (mL).
16	1.8	1.55	0.38	0.07
10	2	1.15	0.42	0.08
4	1.6	1.4	0.35	0.07
13	1	1.1	0.25	0.05
14	1.8	1.55	0.38	0.07
19	1.6	1.4	0.35	0.07
20	1.8	1.55	0.38	0.07

Para la aplicación de la solución inyectable de selenio (selenito de sodio) y vitamina E se utilizó una aguja insulínica con un calibre de 29 G x 13 mm, por vía subcutánea en el dorso del animal (**Figura 1**).



FIGURA 1. Para la aplicación del fármaco se realizó la asepsia de la zona (A) y se administró el selenio y la vitamina E por vía subcutánea (B).

Una semana después de la administración del selenio y la vitamina E, al Grupo A y B se le aplicó 2.0 mL de bacterina toxoide con una aguja insulínica con un calibre de 29 G x 13 mm, vía subcutánea en el dorso. Mientras que al Grupo C se le administraron 2.0 mL de solución salina fisiológica vía subcutánea en el dorso.

También se inició la toma de muestras de sangre de todos los grupos experimentales vía intracardiaca, para ello se posicionó al animal colocándolo en decúbito dorsal sobre una superficie plana, se palpó el tórax para localizar el cartílago xifoides, y se realizó la asepsia de la zona para introducir en un ángulo de 45° una aguja de calibre de 21Gx 1.5" (8.0x 38 mm) utilizando el sistema Vacutainer® se tomó 1.0 mL de sangre en un tubo sin anticoagulante, después se cambió el tubo y se colocó uno que contenía heparina como anticoagulante y se tomó 1.0 mL de sangre.

Los tubos con las muestras fueron centrifugados a 4500 xg durante 5 min para obtener el suero y el plasma los cuales se colocaron en microtubos con capacidad de 1.5 mL, cada muestra se identificó con la fecha de la toma, número de conejo, tipo de anticoagulante y se guardaron a -20 °C. Siete días después se hizo la

segunda aplicación de selenio y vitamina E, por lo que se pesó al Grupo A y se obtuvo la dosis como se mencionó anteriormente, en la **Tabla 6** se puede ver la cantidad administrada a cada animal. Después de la administración del fármaco se hizo la segunda toma de muestras de sangre vía intracardiaca a todos los grupos experimentales.

Tabla 6. Identificación, tercer pesaje y dosis de selenio del Grupo A.

NÚMERO DE ANIMAL.	PESO (Kg).	PESO METABÓLICO.	DOSIS DE SELENIO (mg).	DOSIS DE SELENIO (mL).
16	1.9	1.8	0.45	0.05
10	1.8	1.5	0.38	0.07
4	2	1.6	0.4	0.08
13	1.1	1.0	0.25	0.05
14	1.9	1.8	0.45	0.09
19	1.9	1.8	0.45	0.05
20	1.8	1.55	0.38	0.07

Una semana después de la administración del selenio y vitamina E, fueron revacunados con 2.0 mL del biológico (1×10^6 UFC/ml), vía subcutánea al Grupo A y B, mientras que al Grupo C se le aplicaron 2.0 mL de solución salina fisiológica en el dorso y se tomaron muestras de sangre de todos los grupos experimentales por tercera vez. Posteriormente se hicieron otras dos tomas de muestra con un intervalo de una semana entre cada una de ellas, estas se realizaron con el procedimiento anteriormente mencionado.

5.6. Obtención de antígenos para las pruebas de ELISA.

5.6.1. Sonicado de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2.

Para obtener el antígeno se siguió el método de (Solán et al., 2011) y se realizaron algunas modificaciones, para ello se sembró la bacteria *M. haemolytica* serotipo A2 en agar sangre usando medio estéril utilizando el mechero bunsen, se dejó incubar en una estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas, pasado este tiempo se cosechó la bacteria y se suspendió en un tubo cónico para centrifuga que contenía 20 mL de solución salina fisiológica, se mezcló agitando vigorosamente, y se

centrifugó a 7750 xg (gravidades) durante 5 min. Se colocaron 10 mL de sobrenadante en cada tubo estéril cónico para centrifuga con capacidad de 20 mL y este tubo se colocó en un baño de hielo. Para la lisis de la bacteria se sometió el tubo con la suspensión a ultrasonido programando para 30 seg de trabajo por 30 seg de descanso en el ULTRASONIC PROCESSOR repitiendo este ciclo por 10 veces y el último con duración de un minuto consecutivo y sin descanso (**Figura 2**).

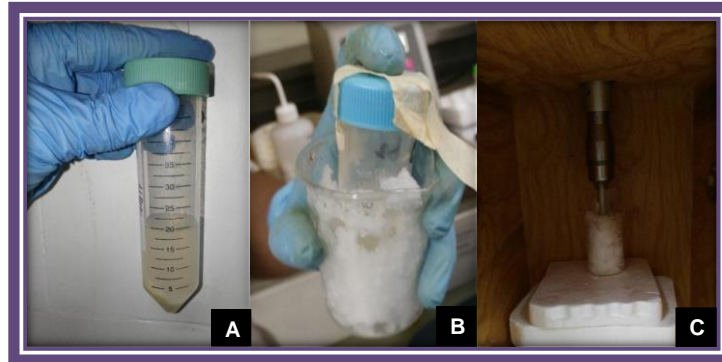


FIGURA 2. Para obtener el antígeno se hizo una suspensión de la bacteria en solución salina (A), y se colocó el tubo cónico para centrifuga en baño de hielo (B), el cual para la lisis de la bacteria se colocó el tubo falcón en el ULTRASONIC PROCESSOR (C).

Una vez terminado este proceso la suspensión del lisado de la bacteria se colocó 1.0 mL en un microtubo, el cual se centrifugó a 750 xg durante 10 min y se colectó el sobrenadante, éste se volvió a centrifugar a 10250 xg, separando el sobrenadante del sedimento, se colocaron en microtubos con capacidad de 1.0 mL, el sedimento se reconstituyó agregando 1.0 mL de solución salina (**Figura 3**).

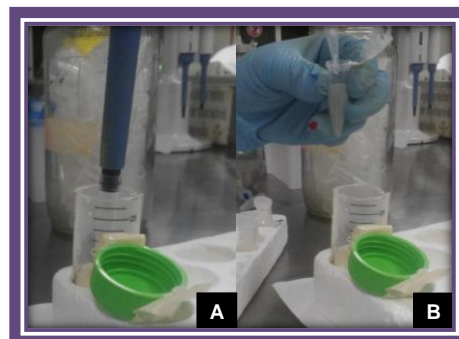


FIGURA 3. El lisado de la bacteria se coloca microtubos para después centrifugar (A) y luego separar el sedimento del lisado de la bacteria y reconstituirlo con solución salina (B).

5.6.2. Obtención de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*.

La producción de la leucotoxina es durante la fase de crecimiento logarítmico de *M. haemolytica* por lo que se obtiene de cepas de serotipo A1 y A2, se determinó si el antígeno obtenido tenía efecto citotóxico sobre leucocitos de ovino.

5.6.2.1. Suspensión de leucocitos de ovino.

Se añadieron 12 mL de sangre de ovino en 20 mL de agua destilada en un tubo cónico para centrifuga, se agitó durante 30 seg, después se mezcló con 20 mL de PBS 2x, hasta observar que se viró a un color vino. A esta mezcla se centrifugó a 3750 xg durante 5 min a temperatura ambiente (**Figura 4**).

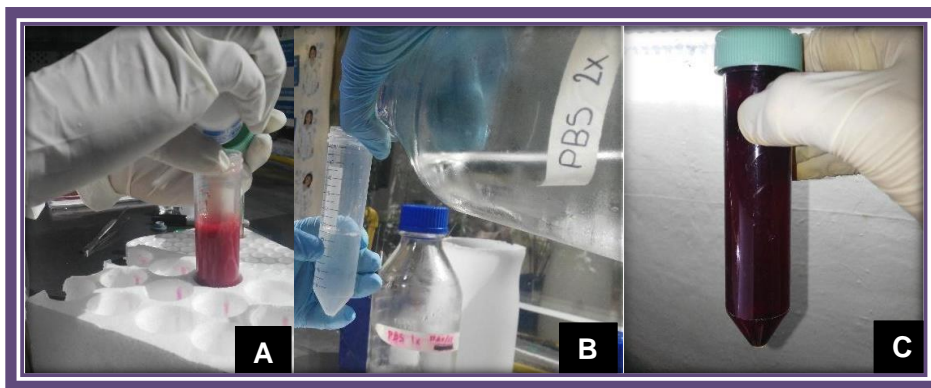


FIGURA 4. Al mezclar sangre de ovino con agua destilada (A) y al agregar PBS 2x (B) se torna color vino (C).

Al sacar el tubo se observaron dos capas una de color roja y en el fondo de este, una capa blanca, se decantó el sobrenadante dejando la capa blanca y se adicionaron 10 mL de PBS 1x. Se volvió a centrifugar a 3750 xg durante cinco minutos, se decantó el sobrenadante y el sedimento se reconstituye con 10 mL de RPMI-1640 (**Figura 5**). Obteniendo así una suspensión de leucocitos de ovino (Mishell *et al.*, 1980).

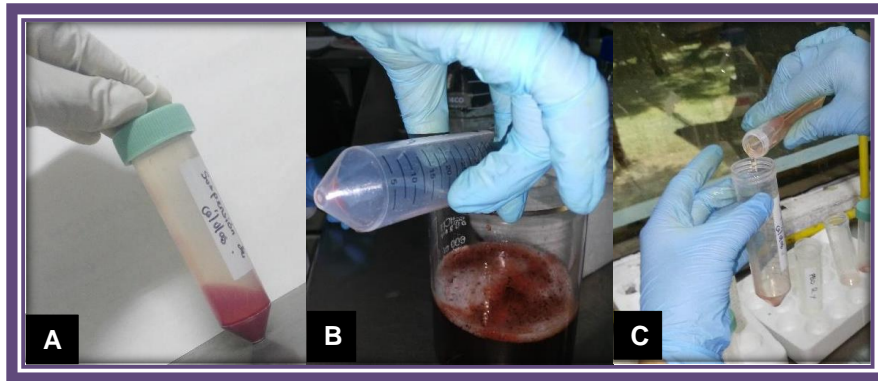


FIGURA 5. Al centrifugar se observa una capa roja y una blanca en el fondo del tubo (A) y se decantó el sobrenadante (B) para reconstituir el sedimento con RPMI (C).

5.6.2.2. Ensayo visual simple para la detección de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*.

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 200 μL de leucotoxina en cada pozo de la columna uno a la doce (A), y en los pozos de las filas B a la H (B) se puso en cada uno 100 μL de RPMI-1640, se realizaron diluciones dobles en la placa (**Figura 6**). Después se añadió 100 μL de la suspensión de leucocitos de ovino en los 96 pozos (**Figura 7**).

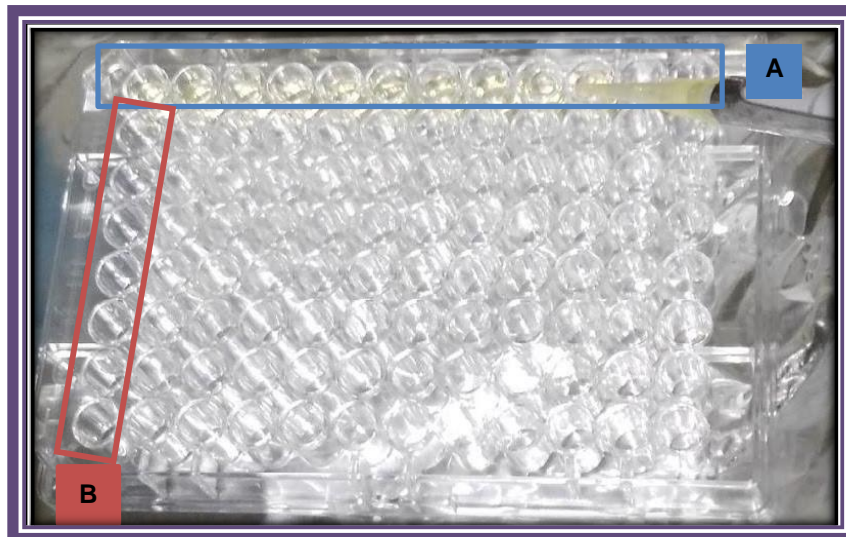


FIGURA 6. En una microplaca de fondo plano se coloca en los pozos de la columna A leucotoxina y en los pozos de la fila B se pone RPMI para re alizar las diluciones.

Se dejó incubar a una estufa bacteriológica a 37 °C durante una hora en movimiento a 800 xg. Al terminar la incubación se centrifugó a 2500 xg a temperatura ambiente durante cinco minutos a temperatura ambiente y se decantó vigorosamente (**Figura 7**).

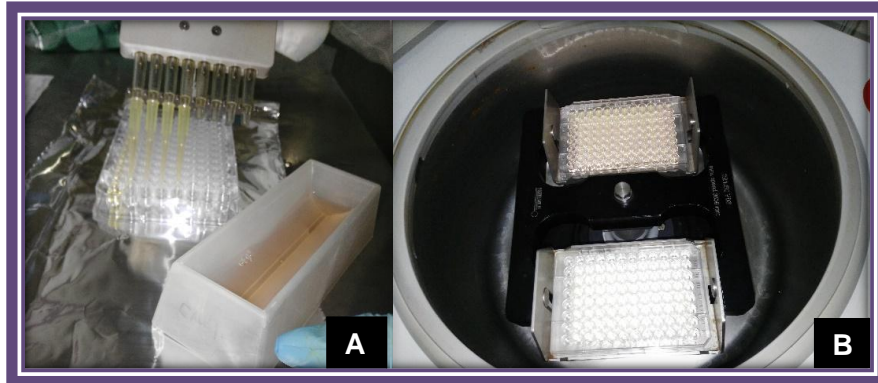


FIGURA 7. Se observa la suspensión de células, la cual fue colocada en todos los pozos de la microplaca (A) para después colocar está en la centrífuga (B).

Se agregaron 50 μ L de formol al 10% a todos los pozos y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Y se adiciono a todos los pozos 50 μ L de cristal violeta al 1% y se decanta, se lava con agua corriente para realizar la lectura (**Figura 8**). Al obtener un fondo claro indica la ausencia de leucocitos por la acción de la leucotoxina que provoca una lisis en estas células (Shewen *et al.*, 1983).

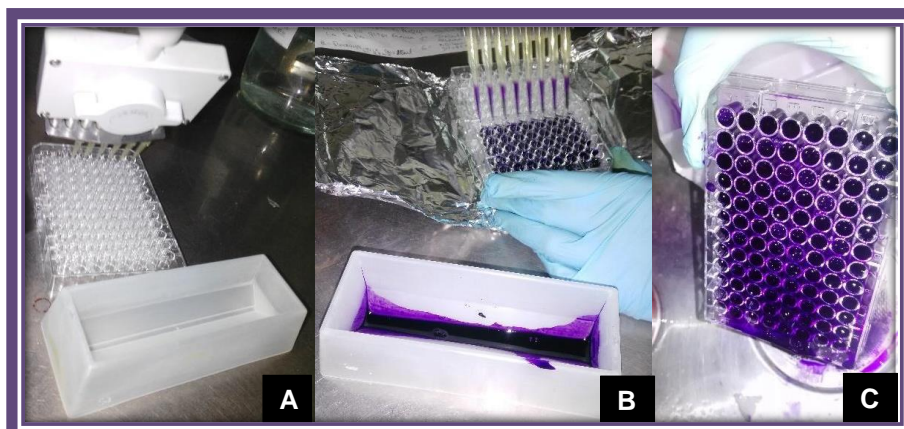


FIGURA 8. A la microplaca se le agrega formol al 10% (A), y después de encubar se añade cristal violeta a cada pozo (B), luego se decanta y se lava la placa (C).

5.7. Métodos analíticos.

5.7.1. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA indirecta).

Para esta técnica se utilizó como antígeno *M. haemolytica* serotipo A2 y también para la leucotoxina de *M. haemolytica* siendo repetida esta prueba para cada uno de los antígenos (Díaz, 2017). Utilizando una microplaca de fondo plano de 96 pozos para ELISA, se colocó en cada pozo 50 μ L de una dilución de 1:20 del antígeno (**Figura 9**), el cual se incubó durante 24 horas a 4 °C. Después se lavó cuatro veces con 300 μ L de PBS1x-Tween 20, se bloqueó colocando 50 μ L de leche descremada al 3% en cada pozo y se dejó incubar una hora a una temperatura de 37° C.



FIGURA 9. En la imagen se observa cómo se colocó el antígeno en cada pozo.

Luego con 300 μ L de PBS1x-Tween 20 se hicieron cuatro lavados, se colocó un control positivo, un control negativo hechos en INIFAP en los primeros dos pozos, en el resto de los pozos se añadió 50 μ L del suero problema (anticuerpo primario) en una dilución 1:20, se incubó durante una hora a 37°C y se hicieron cuatro lavados con 400 μ L de PBS1x-Tween 20.

Se colocó 50 μ L del conjugado o anticuerpo secundario (*Rabbit anti-sheep IgG*) a una dilución de 1:1000 en cada pozo y se incubó durante una hora a 37 °C y se hicieron cuatro lavados con 300 μ L de PBS1x-Tween 20.

Por último, se colocaron 50 μL de sustrato (revelador ABTS) en cada pozo, se dejó reposar durante cinco minutos envuelta en papel aluminio y se hizo la lectura en el espectrofotómetro (BIOTEK FLx800T Microplate Reader) (**Figura 10**) con una longitud de onda de 450 nm (Díaz, 2017).

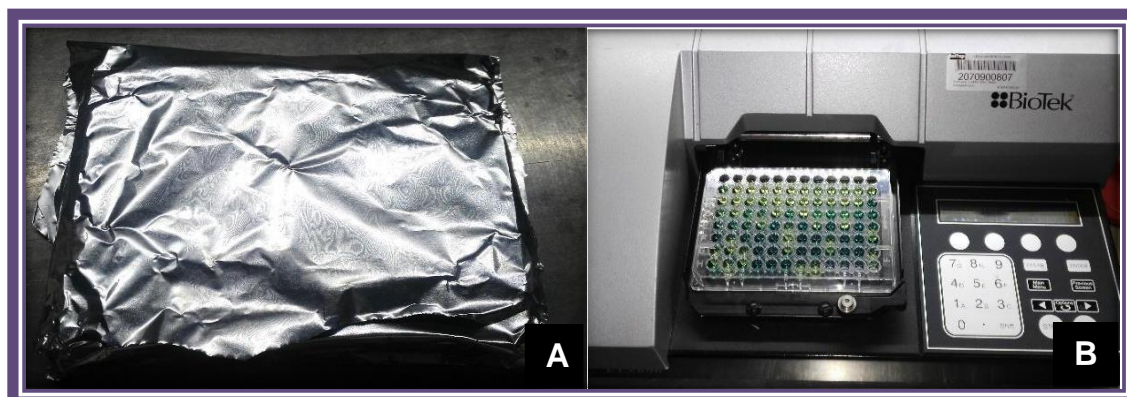


FIGURA 10. La microplaca se incuba a temperatura ambiente (A) y después se realiza la lectura en el espectrofotómetro (B).

5.7.2. Cuantificación de selenio.

Para la cuantificación de selenio las muestras se mantuvieron a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se descongelaron para ser procesadas, estas se sometieron al método de digestión ácida de (Gleason, 2004).

5.7.3. Digestión ácida.

Se pesaron 0.5 mg de muestra utilizando una balanza analítica con capacidad de 250 g y se colocaron en un vaso de teflón (**Figura 11**). A este se le adicionan 5.0 mL de agua mili Q, 2.5 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado y 1.0 mL de H_2O_2 al 30%, se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo se colocó en cada vaso un tapón de teflón y se cerraron los vasos con su respectiva tapa. Se colocó cada chaqueta en un vaso y se acomodaron en el carrusel (**Figura 11**).

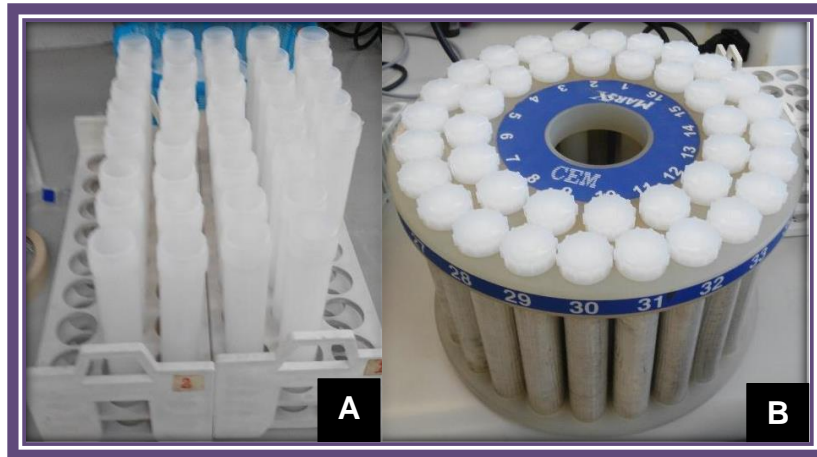


FIGURA 11. Se observan los vasos de teflón con los reactivos (A) los cuales se cerraron y se colocaron en el carrusel (B).

Las muestras se someten a digestión ácida colocando el carrusel en el horno de microondas MARS-digestión CEM, se selecciona el método de acuerdo con la muestra, al finalizar se saca el carrusel, para dejarlo enfriar. Los vasos se sacan del carrusel, se retiran las chaquetas y las muestras se vacían en un matraz aforado con capacidad de 25 mL, y se lleva a volumen con ácido clorhídrico 7 M (Figura 12).

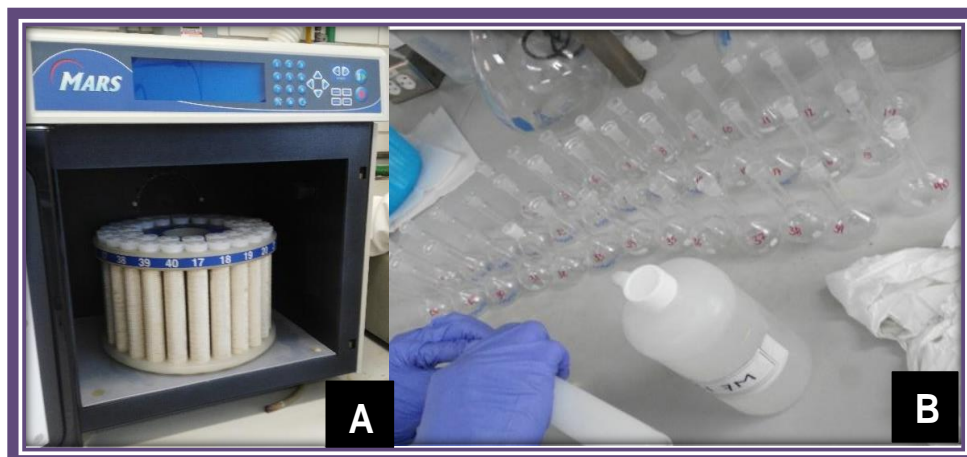


FIGURA 12. Se coloca el carrusel dentro del horno de microondas MARS-digestión CEM (A), una vez terminado el proceso, las muestras se colocan en un matraz y se afora con ácido clorhídrico 7 M (B).

5.7.4. Espectrofotetría de absorción atómica con generador de hidruros.

Para la lectura de las muestras se utilizó el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros Varian ® (**Figura 13**), primero se lee la curva de referencia de 5-25 mg Se/l (Se 42 estándar, High-Purity, $1000 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ in 2% de ácido nítrico. 99.99 de pureza, Scientific Company Selenium Powder) y después las muestras (Díaz, 2017).

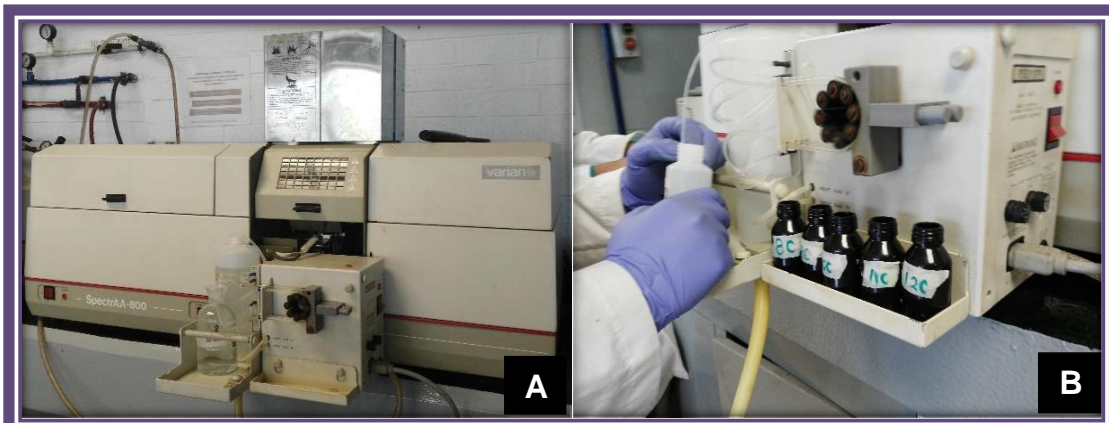


FIGURA 13. Se procesaron en el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros Varian ® (A) para la lectura de las muestras (B).

6. RESULTADOS.

6.1. Cuantificación de selenio en plasma en los grupos experimentales.

Se realizó la evaluación de la cuantificación de selenio en plasma en los grupos experimentales, para ello se hizo un análisis de varianza para determinar si hubo significancia estadística, en el cual se consideró un valor de $P < 0.05$ (**Tabla 7**).

Tabla 7. Análisis de varianza de la cuantificación de selenio en plasma de los grupos experimentales y el grupo control.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD.	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	VALOR F	VALOR P
ENTRE GRUPOS.	0.007	2	0.004	4.990	0.026
DENTRO DE LOS GRUPOS.	0.009	12	0.001		
TOTAL.	0.016	14			

En la **Tabla 7** se aprecia del análisis de varianza de los niveles de selenio en plasma, donde el valor P es 0.026, por lo que hay una relación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre las concentraciones de selenio en plasma entre grupos experimentales.

Para poder apreciar las diferencias de esta variable entre los grupos experimentales se elaboró una gráfica con las medias de la concentración de selenio ($\mu\text{g/g}$) en plasma, donde se ordenaron los datos por grupo (**Figura 14**).

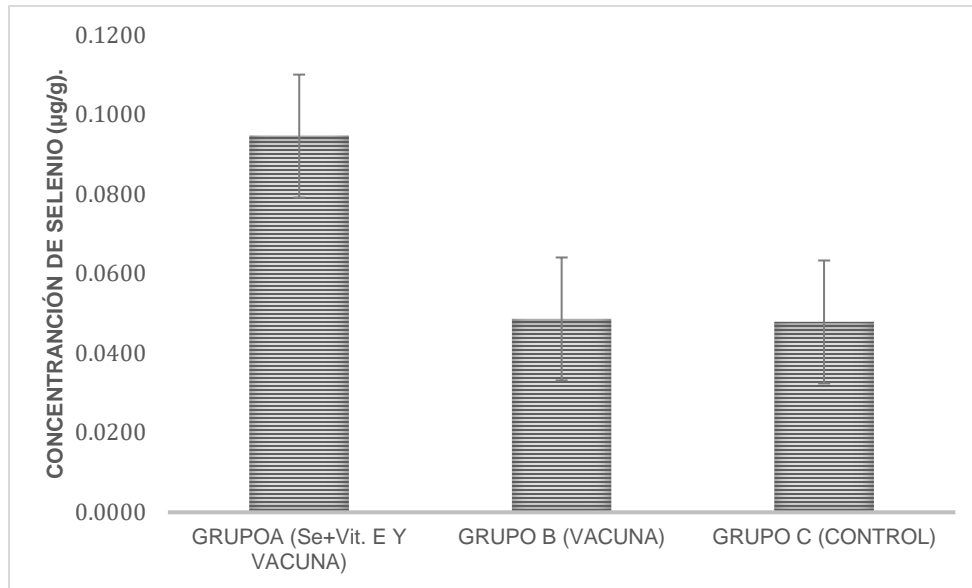


FIGURA 14. Medias de la cuantificación de selenio en plasma de los grupos experimentales y del grupo control. Se observan las medias de la cuantificación de selenio de los grupos experimentales. El Grupo A presenta una concentración promedio de 0.095 µg/g, el cual es diferente ($p < 0.05$) a los Grupos B con un valor de 0.049 µg/g y C con una concentración promedio de 0.048 µg/g sin diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$).

Para identificar entre cuales grupos hay una diferencia se utilizó la prueba estadística de Tukey; para ello se calculó el HSD (*Honestly significant difference*) obteniendo un valor de 0.045, el cual si el valor de HSD es menor al compararlo con el valor obtenido de restar las medias de los grupos significa que hay una diferencia entre esos grupos. En este trabajo se obtuvo para el Grupo A menos el Grupo B un valor de 0.046, para el Grupo A menos el Grupo C un valor de 0.047 y el Grupo B menos el Grupo C un valor de 0.001. Por lo que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo A con respecto al Grupo B y el Grupo C. Por lo que al suplementar selenito de sodio a conejos su concentración de selenio en plasma aumenta en comparación con los que no fueron suplementados.

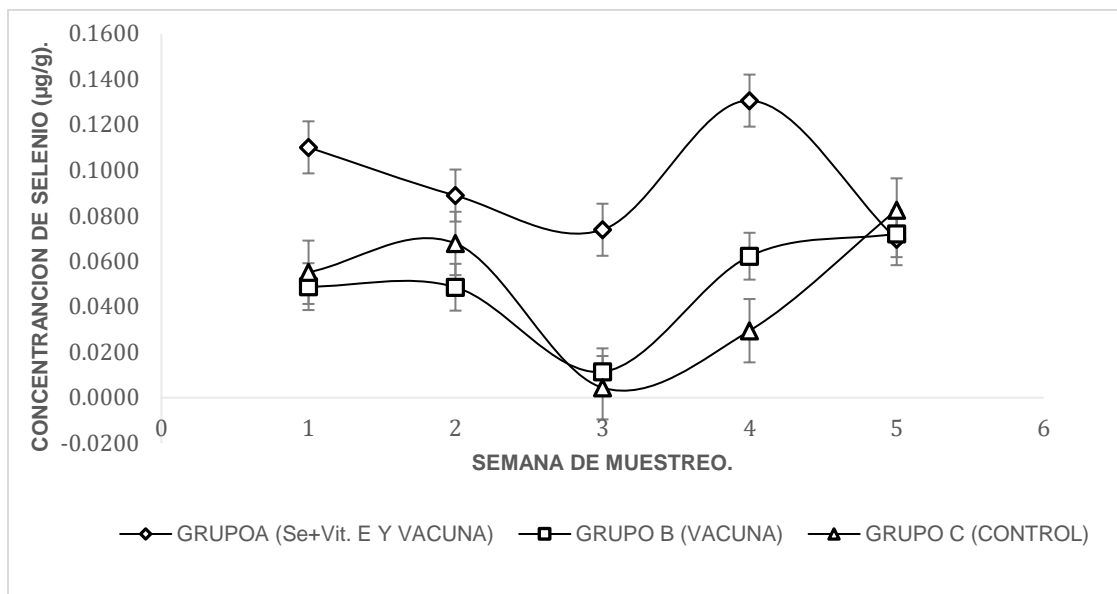


FIGURA 15. Cuantificación de selenio semanal en plasma de los grupos experimentales y del grupo control.

En la **Figura 15**, se observa la cuantificación de selenio en plasma de conejos suplementados y no suplementados con selenio. En donde se aprecia que se tiene una concentración de selenio en plasma promedio mayor para el Grupo A (0.110 µg/g, 0.074 µg/g y 0.131 µg/g) durante la semana 1, 3 y 4 en comparación ($p < 0.05$) con el Grupo B (0.049 µg/g, 0.011 µg/g y 0.062 µg/g) y el Grupo C (0.055 µg/g, 0.004 µg/g y 0.029 µg/g). Mientras que para la semana 2 y 5 no se observa este comportamiento donde el Grupo A (0.089 µg/g y 0.070 µg/g) no tiene diferencias estadísticas ($p > 0.05$) en comparación con el Grupo B (0.049 µg/g y 0.062 µg/g) y el Grupo C (0.068 µg/g y 0.083 µg/g) en las concentraciones de selenio en plasma. Lo cual significa que al suplementar con selenito de sodio a los conejos por vía subcutánea la concentración de selenio en plasma aumenta.

6.2. Evaluación de la respuesta antigénica a *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 en suero de los grupos experimentales.

Se realizó la evaluación de las absorbancias para los antígenos de *M. haemolytica* serotipo A2 obtenidas a través de la técnica de ELISA indirecta de los sueros de los grupos experimentales y el grupo control, de los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza para determinar si hubo significancia estadística entre grupos, en el cual se consideró un valor de $P < 0.05$ (**Tabla 8**).

Tabla 8. Análisis de varianza de las absorbancias para el antígeno *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 de los sueros de los grupos experimentales y del grupo control.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD.	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	VALOR F	VALOR P
ENTRE GRUPOS.	0.369	2	0.185	7.096	0.009
DENTRO DE LOS GRUPOS.	0.312	12	0.026		
TOTAL.	0.682	14			

En la **Tabla 8**, se observa el análisis de varianza para el serotipo A2 de *M. haemolytica* donde el valor P es de 0.009, por lo que hay una relación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre la respuesta antigénica a *M. haemolytica* serotipo A2 entre los grupos de estudio.

Para poder apreciar las diferencias de esta variable se elaboró una gráfica con las medias y errores estándar de las absorbancias, ordenadas por grupo de estudio (**Figura 16**).

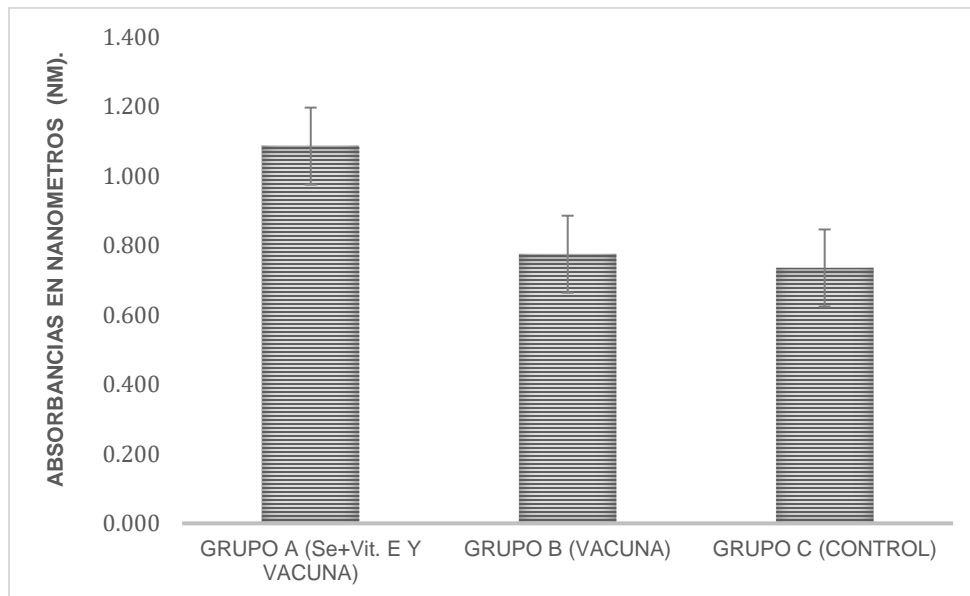


FIGURA 16. Medias de absorbancias totales de los grupos experimentales y el grupo control al antígeno *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 en suero. Se observan las medias y los errores estándar de las absorbancias para el antígeno de *M. haemolytica* serotipo A2 en suero de los grupos experimentales. El Grupo A presentó una absorbancia promedio de 1.086 nm, el cual muestra una diferencia ($p < 0.05$) con los Grupos B con un valor de 0.775 nm y C con un valor de 0.736 nm, los cuales promedian una absorbancia menor que el Grupo A.

Para identificar entre cuales grupos hay una diferencia se utilizó la prueba estadística de Tukey; para ello se calculó el HSD (*Honestly significant difference*) obteniendo un valor de 0.272, el cual si el valor de HSD es menor al compararlo con el valor obtenido de restar las medias de los grupos significa que hay una diferencia entre esos grupos. En este trabajo se obtuvo para el Grupo A menos el Grupo B un valor de 0.311, para el Grupo A menos el Grupo C un valor de 0.351 y el Grupo B menos el Grupo C un valor de 0.040. Por lo que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo A con respecto al Grupo B y el Grupo C. Por lo que la suplementación a los conejos del Grupo A provoca una mayor concentración de selenio en plasma y estos tienen una mejor respuesta al antígeno de *M. haemolytica* serotipo A2, que los grupos que no fueron suplementados.

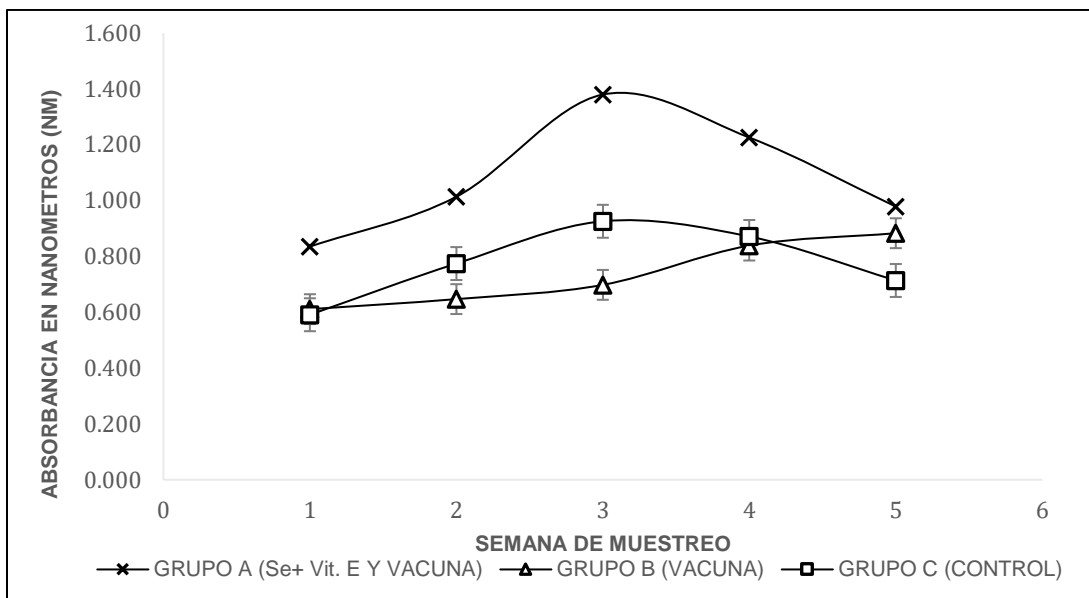


FIGURA 17. Absorbancias promedio semanal para el antígeno *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 de los sueros de los grupos experimentales y del grupo control.

En la **Figura 17**, se observan las absorbancias obtenidas a la respuesta antigénica de *M. haemolytica* serotipo A2 de los sueros de conejos suplementados y no suplementados con selenio. Durante las semanas 1, 2, 3 y 4, hay una diferencia ($p < 0.05$), para el Grupo A (0.835 nm, 1.014 nm, 1.380 y 1.226 nm) teniendo durante esas semanas absorbancias promedio más altas, en comparación con el Grupo B (0.611 nm, 0.647 nm, 0.698 nm y 0.839) y el Grupo C (0.591 nm, 0.774 nm, 0.926 nm y 0.871 nm). En cuanto a la semana 2 y 5 no se observa este comportamiento en las absorbancias para el Grupo A en comparación con el Grupo B y el Grupo C ($p > 0.05$). Por lo que los conejos suplementados del Grupo A tienen una mejor respuesta al antígeno de *M. haemolytica* serotipo A2 en suero.

6.3. Evaluación de la respuesta antigénica a la Leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* en suero de los grupos experimentales.

Se realizó la evaluación de las absorbancias para la leucotoxina de *M. haemolytica* obtenidas a través de la técnica de ELISA indirecta de los sueros de los grupos

experimentales, para ello se hizo un análisis de varianza para determinar si hubo significancia estadística, en el cual se consideró un valor de $P < 0.05$, como se ve en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Análisis de varianza de las absorbancias para la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* de los sueros de los grupos experimentales y el grupo control.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD.	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	VALOR F	VALOR P
ENTRE GRUPOS.	0.827	2	0.414	4.026	0.046
DENTRO DE LOS GRUPOS.	1.233	12	0.103		
TOTAL.	2.060	14			

En la **Tabla 9** se aprecia el análisis de varianza para el antígeno de leucotoxina de *M. haemolytica* donde el valor P es de 0.046, por lo que hay una relación ($P < 0.05$) a la respuesta antigénica a la leucotoxina de *M. haemolytica* entre los grupos de estudio. Para poder apreciar las diferencias de esta variable entre los grupos experimentales se elaboró una gráfica con las medias y errores estándar de las absorbancias, las cuales se ordenaron los datos por grupo (**Figura 18**).

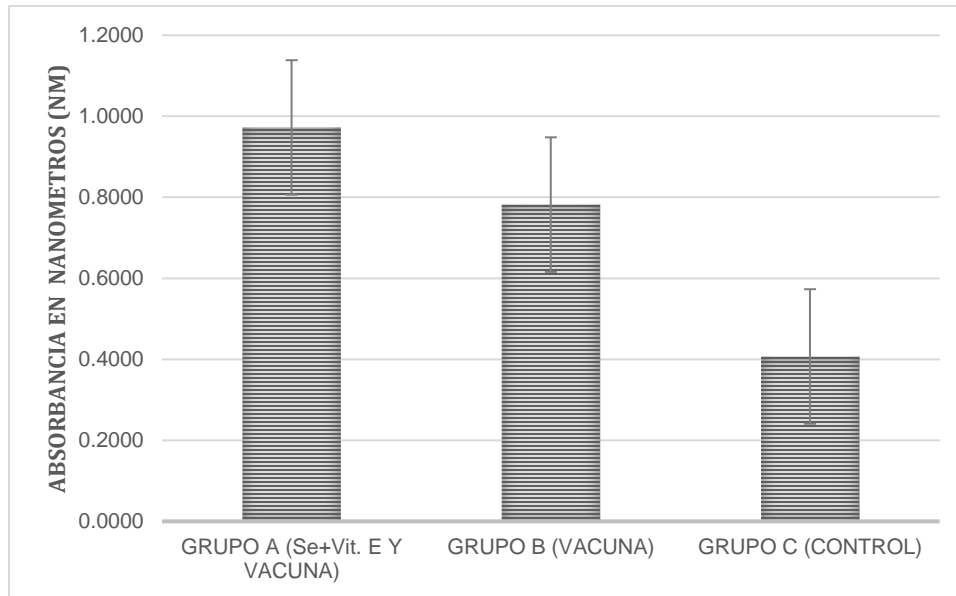


FIGURA 18. Medias de absorbancias de los grupos experimentales y del grupo control de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 en suero. Se observan las medias y los errores estándar de las absorbancias para la leucotoxina de *M. haemolytica* en suero de los grupos experimentales. El Grupo A con un promedio de 0.972 nm y B con un promedio de 0.877 nm sin tener diferencia entre estos grupos ($p > 0.05$), sin embargo, el Grupo C presentó una absorbancia de 0.407 nm, siendo estadísticamente menor que los Grupos A y B ($p < 0.05$).

Para identificar entre cuales grupos hay una diferencia se utilizó la prueba estadística de Tukey; para ello se calculó el HSD (*Honestly significant difference*) obteniendo un valor de 0.540, el cual si el valor de HSD es menor al compararlo con el valor obtenido de restar las medias de los grupos significa que hay una diferencia entre esos grupos. En este trabajo se obtuvo para el Grupo A menos el Grupo B un valor de 0.190, para el Grupo A menos el Grupo C un valor de 0.565 y el Grupo B menos el Grupo C un valor de 0.375. Por lo que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo A con respecto al Grupo C. Por lo que los conejos suplementados del Grupo A no tuvieron una mejor respuesta al antígeno de la leucotoxina de *M. haemolytica*, en comparación con los grupos que no fueron suplementados.

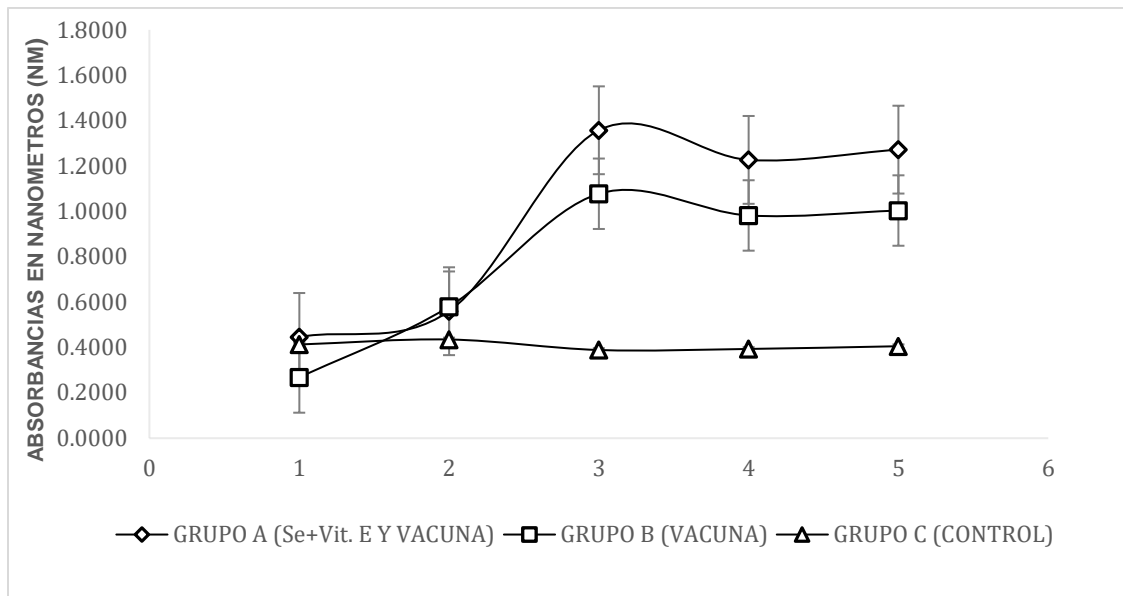


FIGURA 19. Promedio semanal de las absorbancias para la respuesta antigénica de la leucotoxina de *M. haemolytica* de los sueros de los grupos experimentales y del grupo control.

En la **Figura 19** se observan las absorbancias obtenidas para la respuesta antigénica de la leucotoxina de *M. haemolytica* de sueros de conejos suplementados y no suplementados con selenio. No se observaron diferencias estadísticas significativas en el promedio de las absorbancias ($p > 0.05$) para el Grupo A (0.446 nm, 0.560 nm, 1.357 nm, 1.227 nm y 1.272 nm) durante toda la experimentación en comparación con el Grupo B (0.268 nm, 0.580 nm, 1.078 nm, 0.982 nm y 1.004 nm), a partir de la semana 3 se observan diferencias del Grupo A y el Grupo B con respecto al Grupo C (0.413 nm, 0.435 nm, 0.389 nm, 0.393 nm y 0.405 nm) el cual presenta promedios de absorbancia menores en comparación al Grupo A y B en las últimas semanas del estudio ($p < 0.05$). Por lo cual la suplementación a los conejos no aumento la respuesta al antígeno de la leucotoxina de *M. haemolytica* en comparación con los que no fueron suplementados.

7. DISCUSIÓN.

En la mayor parte del territorio mexicano hay deficiencia de selenio en los suelos, por lo que ha sido necesario suministrar este mineral en la dieta, el cual, junto con la vitamina E tiene diversos efectos benéficos en el organismo, por ejemplo, mejorar la respuesta inmune. En el presente trabajo se utilizó al conejo como modelo biológico para observar el efecto de la suplementación con selenio y vitamina E por vía subcutánea, y de esta forma evaluar los niveles de selenio en plasma, además la respuesta a los antígenos inoculados.

No existe una recomendación clara sobre la cantidad apropiada de selenio suplementario para administrar a los conejos (Zhang *et al.*, 2011). Aunque hay poca información disponible, se piensa que el requisito de selenio de conejos es bajo, según el NRC se recomienda una cantidad de selenio adicional de 0.05 mg/ kg de alimento, debido a sus efectos potenciales sobre otras funciones fisiológicas, como un componente de complejos de enzimas, principalmente selenoproteínas (Castellini *et al.*, 2002; Papadomichelakis *et al.*, 2017).

Se ha reportado que los niveles adecuados de selenio en plasma de conejo son de 0.074 a 1.000 ppm (Puls, 1988). En este estudio los conejos suplementados del Grupo A tuvieron un promedio de 0.095 µg/g de selenio en plasma para todo el estudio (**Figura 14**), Muller en 2002 suplementó selenio en conejos Nueva Zelanda hembras, utilizando una dosis de 0.40 mg/kg en la dieta durante 10 semanas, los cuales presentaban niveles basales de 104 µg/L (0.104 ppm), después de la suplementación los animales de 1109.5 a 206.8 µg/L equivalentes a 1.110 a 0.207 ppm, la suplementación de selenio por vía subcutánea aumenta los niveles en plasma después de una semana, manteniéndose los niveles por 3 semanas como se observó en este trabajo.

El nivel de selenio en plasma para los grupos no suplementados B y C fue en promedio de 0.048 µg/g para todo el experimento (**Figura 14**), a pesar de que no se han reportado valores en conejos con deficiencia de selenio, en comparación con

otras especies donde se ha identificado que los rumiantes son más susceptibles a la deficiencia de este mineral, en especial en ovinos y caprinos. Se ha visto que la digestibilidad y absorción de este mineral es muy baja en rumiantes en comparación con los monogástricos, cuando el selenio es administrado en forma de selenato, se absorbe principalmente en el duodeno, entra al organismo y se reduce a selenito, uniéndose a las proteínas del plasma; así es llevado por la corriente sanguínea al hígado y al bazo, en donde es reducido a selenio elemental, por la glucosa, que lo lleva a todos los tejidos excepto a los grasos (Villanueva, 2011). Esta mayor susceptibilidad de los rumiantes se atribuye al ambiente retículo- ruminal, que genera formas no solubles en particular seleniuros (Harrison *et al.*, 1984), por lo que eso explicaría la menor absorción de selenio en rumiantes que, en monogástricos, 29-35% en rumiantes y del 77 al 85% en monogástricos, cuando es administrado como selenito por vía oral (Sarabia, 2004; Carbajal *et al.*, 2013). Sin embargo, hay estudios en conejos donde se ha medido selenio en plasma a los cuales se les ha dado una dieta baja en este mineral, donde se tiene un rango promedio de 26.6 a 55.11 µg/L equivalentes a 0.027 a 0.055 ppm (Muller *et al.*, 2002), los cuales, aunque no son considerados como una deficiencia de selenio, pero podrían ser críticos para el funcionamiento celular normal.

En cuanto a los muestreos semanales encontramos que el Grupo A que fue suplementado con selenio y vitamina E, durante las semanas 1, 3 y 4 tiene una concentración de selenio en plasma mayor ($p < 0.05$) comparado con el Grupo B y el Grupo C los cuales no fueron suplementados, sin embargo, durante la semana 2 y 5 tienen un decremento en la concentración de selenio en plasma para los grupos experimentales y el control (**Figura 15**). Esto también se pudo apreciar en un estudio con porcinos suplementados con selenio, donde se vio que las concentraciones de plasma aumentaron significativamente desde el inicio del estudio hasta el día 46 antes del desafío con lipopolisacáridos (LPS), donde los niveles de selenio en plasma fueron disminuyendo después del desafío con LPS, pero no alcanzaron niveles considerados deficientes en selenio, otros autores han mostrado un estado decreciente de selenio durante las infecciones en humanos, roedores y cerdos, lo

que podría deberse a un cambio en el patrón de síntesis de selenoproteínas (Falka, 2018).

Se sabe que, a través de la incorporación de selenio a las selenoproteínas, este mineral participa en la regulación del estrés oxidativo y otros procesos celulares cruciales en casi todos los tejidos y tipos de células, incluidos aquellos involucrados en respuestas inmunes innatas y adaptativas. La síntesis de selenoproteínas está regulada por la disponibilidad de selenio, y cuando esta es limitada, se suministra para la síntesis de ciertas selenoproteínas a expensas de otras (Howard *et al.*, 2013; Seyedali *et al.*, 2014; Dalgaard *et al.*, 2018).

Al evaluar la eficacia para la respuesta antigénica a *M. haemolytica* serotipo A2 en suero se encontró que el Grupo A el cual fue suplementado presentó una absorbancia promedio de 1.086 nm para todo el estudio, la cual es mayor la absorbancia promedio del Grupo B y el Grupo C, los cuales promedian un valor de 0.755 nm en todo el estudio ($p < 0.05$) (**Figura 16**), como se han visto en otros estudios, por ejemplo en terneros búfalos Murrah concluyó que la suplementación de selenio fue útil para reducir el estrés oxidativo y mejorar la respuesta inmune humoral contra los antígenos de *Pasteurella multocida*. Estudios previos en animales bovinos también han demostrado que las funciones antioxidantes de GSHPx son la razón principal de que el selenio mejora las respuestas inmunes innatas. También se ha informado en ovejas una mayor respuesta inmune mediada por anticuerpos contra antígenos de *P. multocida* debido a la suplementación de 0.3 ppm de selenio en la dieta (Kumar *et al.*, 2009, Mudgala, 2018).

A pesar de que los estudios en conejos son limitados se ha reportado que en conejos raza California alimentados con selenio y vitamina E, y desafiados contra glóbulos rojos de las ovejas (SRBC) los títulos de anticuerpos fueron más altos en comparación con su grupo control, estos resultados sugieren que la vitamina E y el selenio pueden tener efectos sinérgicos en las respuestas inmunes (Ebeid *et al.*, 2013).

En condiciones fisiológicas como estrés o infección, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) participa en la activación y señalización de diversos sistemas endógenos (Vladimirov *et al.*, 2009). Se ha visto que algunas células fagocíticas dependen de la producción de ROS en sus actividades bactericidas durante la inflamación, y los sistemas antioxidantes son cruciales para prevenir el daño de las células huésped (McKenzie *et al.*, 1998). Por lo tanto, la producción de ROS tendría efectos positivos en la lucha contra los patógenos invasores, pero si la oxidación no se controla debido al exceso de electrones de las mitocondrias, los productos reactivos de oxígeno pueden inducir daños en el epitelio del huésped.

La función mejor conocida de la vitamina E es su actividad antioxidante, esto es importante, pues las células del sistema inmune, que proliferan rápidamente tras una estimulación, son particularmente susceptibles a lesiones causadas por radicales libres, peróxidos y superóxidos, puede alterar significativamente la fagocitosis de macrófagos y varias de sus etapas constitutivas, como lo son la adhesión, la migración, la ingestión y la producción del anión superóxido. También se ha demostrado que pueden afectar la actividad monocítica, producción de inmunoglobulinas, producción de citoquinas y mediadores de la inflamación tales como prostaglandina E2 (PGE2) (Erickson *et al.*, 2000). Estos compuestos juegan un importante como reguladores de los procesos biológicos, incluyendo la respuesta inmune. Por lo tanto, el papel central de la vitamina E en la mejora de la respuesta inmune y de los procesos de fagocitosis, es la prevención de la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares (Fisher, 2008).

El selenio es un componente principal de la enzima glutatión peroxidasa, la cual está implicada en la eliminación del peróxido de hidrógeno y de las reacciones de tipo REDOX (reducción-oxidación) en las células (Campos, 2015).

Los GPX participan en la señalización del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la desintoxicación de hidroperóxidos y el mantenimiento de la homeostasis REDOX celular, (Lubos *et al.*, 2011). La GPX1 es la selenoproteína más abundante en mamíferos, y es una enzima presente en el citosol y en las mitocondrias que cataliza

la reducción de H₂O₂ dependiente de GSH (glutati6n) en agua (Labunskyy *et al.*, 2014). La expresi6n de esta enzima es m1s sensible a los cambios en el estado del selenio y en las condiciones de estr1s oxidativo. Al parecer la sntesis de prote1nas se reduce en condiciones de estr1s para reservar recursos y la GPX1 se recupera m1s r1pidamente en comparaci6n con otras selenoprote1nas (Papp *et al.*, 2007).

En lo que respecta a la evaluaci6n a la respuesta antig1nica para la leucotoxina de *M. haemolytica*, al comparar las absorbancias obtenidas en todo el estudio para el Grupo A el cual fue suplementado y el Grupo B que no fue suplementado, no se encontr6 diferencias estad1sticas significativas ($p > 0.05$), pero ambos grupos tuvieron diferencias con respecto al Grupo C ($p > 0.05$), el cual no tuvo una respuesta al ant1geno tal como se esperaba en el estudio. Sin embargo, las absorbancias muestran en las primeras dos semanas un crecimiento exponencial para este ant1geno hasta llegar a mantenerse a partir de la semana 3 hasta la 1ltima de la semana del experimento sin haber un descenso en la respuesta a la leucotoxina de *M. haemolytica* (**Figura 19**).

Es importante mencionar que la informaci6n sobre el efecto del selenio y la vitamina E y su efecto en la respuesta antig1nica en esta especie es reducida, sin embargo, en otras especies se ha visto resultados ambiguos. Por un lado, se informa que la suplementaci6n diet1tica con selenio ha tenido un efecto beneficioso y positivo en pollos en la inducci6n de anticuerpos espec1ficos por las vacunas contra el virus de la enfermedad infecciosa bursal (Arshad *et al.*, 2005; Shekaro *et al.*, 2012). En contraste, cuando se estudi6 la influencia de selenio en la inmunidad de los pollos de engorde mediante la suplementaci6n en el alimento de selenio org1nico en varias concentraciones (0, 100, 200, 300 o 400 μg / kg de dieta), no se encontr6 ning1n efecto en la producci6n de anticuerpos espec1ficos para vacuna contra el virus de la enfermedad de Newcastle (Rao *et al.*, 2013, Dalgaard *et al.*, 2018). Por otro lado, en un estudio en porcinos que fueron alimentados con dietas suplementadas con selenito de sodio (0-1.5 mg / kg). Las concentraciones de selenio en sangre total aumentaron linealmente a medida que aumentaba el selenio en la dieta, pero no se

observó ningún efecto en las respuestas de anticuerpos en términos de títulos de IgG a lisozima y ribonucleasa (Blodgett *et al.*, 1986, Dalgaard *et al.*, 2018). En este estudio los conejos suplementados no tuvieron una mayor respuesta a la leucotoxina de *M. haemolytica* en comparación a los conejos que no se les suministro el selenito de sodio.

En cuanto al antígeno de la leucotoxina se sabe que induce efectos biológicos en los leucocitos bovinos de una manera especie-específica, por lo cual el conejo no es huésped de este antígeno, sin embargo, podría tener efectos similares en el sistema inmune de estos como en bovinos en donde la leucotoxina pone al sistema del huésped a trabajar en beneficio de la bacteria y deja a los tejidos de dicho portador desvalido en contra de la infección. La inducción de la secreción y la liberación de péptidos quimiotácticos vasoactivos por los macrófagos, aumenta el número de leucocitos disponibles en el lugar de la inflamación, en donde se producen depósitos fibrinosos este proceso culmina en una neumonía fibrinopurulenta aguda. Cualquier oportunidad de respuesta inmune secundaria es interrumpida por la actividad de la leucotoxina, que previene la blastogénesis de los linfocitos (Jaramillo *et al.*, 2009).

Por otro lado, hay un estudio en caprinos donde se evaluó la respuesta inmune contra *M. haemolytica* para evaluar IgG, y como en este estudio se administró de una bacterina-toxoide, la cual contiene *P. multocida* tipo A, *M. haemolytica* serotipo A1 y A2 y leucotoxoide de *M. haemolytica*. En donde no se observaron diferencias significativas en las absorbancias de IgG en los grupos de estudio los primeros 28 días del experimento, sin embargo, los grupos con selenio 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 (Díaz, 2017). Sin embargo, en este estudio no se evaluaron a todos los antígenos que contenía la bacterina toxoide, solo centrándose en *M. haemolytica*, y no se hicieron pruebas para ver efecto en la respuesta antigénica para la leucotoxina. En cuanto este estudio se utilizó para la evaluación antigénica un pool de la bacteria la cual contenía

varios antígenos de *M. haemolytica* serotipo A2, pero no se determinó a cuál de estos se montó la respuesta sin embargo en estudios en México (Jaramillo en el 2000), lograron la purificación de una adhesina que fue capaz de aglutinar específicamente eritrocitos de conejo, concluyendo que las adhesinas de *M. haemolytica* juegan un importante papel en la infección. Lo cual puede sugerir que se haya encontrado una respuesta antigénica más marcada a *M. haemolytica* serotipo A2 que los hallados para la leucotoxina en este estudio.

Al ser el conejo un animal de bajo costo, es fácil de cuidar y mantener, además de tener una buena calidad y cantidad de anticuerpos (Fuentes *et al.*, 2010) es un buen modelo experimental, sin embargo, se necesita más investigación sobre el selenio y vitamina E en relación con la respuesta antigénica y las respuestas inmunes humorales, para comprender el efecto del selenio sobre éstas, ya que se ha visto efectos de la suplementación no afectarían necesariamente los niveles de IgG e IgM de una manera idéntica. También se pueden esperar diferentes efectos en las respuestas de anticuerpos dirigidas contra antígenos dependientes de T frente a antígenos independientes de T (Dalgaard *et al.*, 2018). Además de profundizar en las diferentes formas que hay para la suplementación de este mineral ya sea parenteral o en la dieta y establecer la cantidad adecuada para suplementar en esta especie.

8. CONCLUSIÓN.

Al lograr administrar por vía subcutánea selenito de sodio y vitamina E como suplemento a conejos, se determinaron las concentraciones en plasma, encontrando que los animales suplementados tuvieron una mayor concentración de selenio en plasma.

Mediante la técnica de sonicación, fue posible obtener antígenos somáticos de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2, los cuales fueron utilizados en una técnica inmunoenzimática ligada a enzimas para evaluar la respuesta a este antígeno.

Los resultados de este estudio podrían sugerir que la suplementación con estos antioxidantes tienen efectos positivos sobre la respuesta a estos antígenos como también se ha visto en pequeños rumiantes; al utilizar el conejo como modelo biológico para evaluar la respuesta antigénica, se encontró para *M. haemolytica* serotipo A2 se obtuvo valores de absorbancia mayores para el Grupo A que fue suplementado teniendo una mejor respuesta a estos antígenos, no siendo así para los grupos que no fueron suplementados.

En cuanto la leucotoxina de *M. haemolytica*, al evaluar las absorbancias obtenidas no se encontraron efectos positivos a la respuesta a este antígeno de los conejos del Grupo A que fueron suplementados en comparación con los demás Grupos que no fueron suplementados.

9. LITERATURA CITADA.

1. Abdel-Khalek AM, (2013). Supplemental antioxidants in rabbit nutrition: A review. *Livestock Science*, 158, 95–105.
2. Apaza PJJ, (2014). Vitaminas liposolubles. *Rev. de Actualización Clínica*, 4, 565-568.
3. Arshad M, Siddique M, Ashraf, M, Khan HA, (2005). Effect of selenium supplementation on antibody titres against infectious bursal disease vaccine broiler chicks. *Pak. Vet. J.* 25, 203–204.
4. Beckett GJ, Arthur JR, (2005). Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*, 184(3), 455–465.
5. Berg AG, (2010). Vitamina E: un tema siempre presente, nunca concluido. *Rev. Argentina de Cardiología*, 78(5), 391–392.
6. Blodgett DJ, Schurig GG, Kornegay ET, (1986). Immunomodulation in weanling swine with dietary selenium. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1517–1519.
7. Campos GCM, (2015). El Impacto de los Micronutrientes en la inmunidad de los animales. *Nutrición Animal Tropical*, 9(1), 1–23.
8. Candia LR, De Paz FJA, Costa MO, (2015) ¿Son efectivos los suplementos antioxidantes en la disminución del dolor muscular tardío? Una revision sistematica. *Nutricion Hospitalaria*, 31(1), 32–45.
9. Carbajal, HMA, Aquí, QG, Díaz GC, (2013). Uso De Selenio En Ovinos. *Abanico Veterinario*, 3(1), 44–54.
10. Castellini, C, Lattaioli, P, Dal Bosco A, Beghelli D, (2002). Effect of supranutritional level of dietary a- tocopheryl acetate and selenium in rabbit semen. *Theriogenology*, 58, 1723- 1732.
11. Coreno HO, García VS, Ayala MM, Soto SS, Ojeda RD, Zepeda BA, Zepedattr BA, (2017). Efecto del consumo de vinagre y una bebida fermentada sobre la calidad de la canal y carne de conejos. *Abanico Veterinario*, 7(1), 48–52.
12. Dalgaard ST, Briensb M, Engberga MR, Lauridsena C, (2018). The influence of selenium and selenoproteins on immune responses of poultry and pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 238, 73-83.

13. De la Cruz SE, Pino OJ, Moreno CMI, Cañadas AM, Ruiz RAJ, (2008). Micronutrientes antioxidantes y actividad física: evidencias de las necesidades de ingesta a partir de las nuevas tecnologías de evaluación y estudio del estrés oxidativo en el deporte. *RETOS. Nuevas Tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación*, 13, 11-14
14. Díaz SVM, (2017). Evaluación de la capacidad antioxidante de bolos de selenio y su efecto sobre la respuesta inmune. Tesis (Doctorado). Universidad Nacional Autónoma De México.
15. Ebeid TA, Zeweil H, Basyony M, Badry H, (2012). The Impact of Incorporation of Organic Selenium Into Meat on Growth Performance , Antioxidative Status, and Immune Response in Growing Rabbits. *Proceedings 10 th World Rabbit Congress*, 861–864.
16. Ebeid TA, Zeweil HS, Basyony MM, Dosoky WM, Badry H, (2013). Fortification of rabbit diets with vitamin E or selenium affects growth performance, lipid peroxidation, oxidative status and immune response in growing rabbits. *Livestock Science*, 155(2–3), 323–331.
17. Elghany AH, (2007). Deficiencia y suplementación de selenio en pequeños rumiantes. Tesis (Doctorado) Universidad Nacional Autónoma De México.
18. Erickson, K., Medina, E. y Hubbard, N. (2000). Micronutrients and innate immunity. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(1), 5–10.
19. Falka, M, Bernhoftb, A, Framstadc, T, Salbud, B, Wisloffb, H, Kortnere TM, Kristoffersenb BA, Oropeza MM, (2018). Effects of dietary sodium selenite and organic selenium sources on immune and inflammatory responses and selenium deposition in growing pigs. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 527-536.
20. Febles FC, Soto, FC, Saldaña BA, García TBE, (2002). Funciones de la vitamina E. Actualización. *Rev. Cubana de Estomatología*, 39(1), 28–32.
21. Finley WJ, (2005). Selenium Accumulation in Plant Foods. *Nutrition Reviews*, 63(6), 196–202.

22. Fisher, G. (2008). Micronutrients and animal nutrition and the link between the application of micronutrients to crops and animal health. *Turk. J. Agric.*, 32, 221-233.
23. Fraire CS, Pró-Martínez A, Ramírez GV, Sánchez. DRC, Gallegos SJ, (2013). Selenio y vitamina e en la fertilidad de ovejas pelibuey sincronizadas con progesterona. *Pelibuey*, 29(1), 33–44.
24. Fuentes PF, Mendoza YRA, Rivera RR, Vara MMDV, (2010). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos, *Instituto Nacional de Salud, Perú*.
25. García VL, Ayala MM, Zepeda BA., Ojeda RD, Soto SS, (2017). Evaluación de parámetros productivos y rendimiento de la canal de conejos que consumieron infusión de epazote (*Chenopodium ambrosioides*). *Abanico Veterinario*, 7(1), 44–47.
26. Grundner E, Grundner C, Glover WMIII, Tujebajeva R, Harney JW, Berry MJ, (2001). Interplay Between Termination and Translation Machinery in Eukaryotic Selenoprotein Synthesis. *J. Mol. Biol.* 310, 699-707.
27. Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR, (1984). Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J Dairy Sci.*; 67(1):123-132.
28. Hernández RAJ, Ilarraza PCI, Chaparro MAI, Castellano SEE; Imery PGA, Cantele PHE, Troconis TE, (2012). El conejo como modelo experimental de entrenamiento en cirugía Laparoscópica pediátrica. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 75 (1), 6-10.
29. Howard MT, Carlson BA, Anderson CB, Hatfield DL, (2013). Translational redefinition of UGA codons is regulated by selenium availability. *J. Biol. Chem.* 288, 19401–19413
30. Jaramillo ACJ, Trigo TFJ, Suárez GF, (2009). Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet. Méx.*, 40 (3).
31. Jaramillo L, Díaz F, Hernández P, Debray H, Trigo F, Mendoza G *et al.*, (2000). Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology*; 10:31-37.

32. Kasaikina MV, Hatfield DL, Gladyshev VN, (2012). Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 1633–1642.
33. Kumar N, Garg, AK, Dass RS, Chaturvedi VK, Mudgal V, Varshney VP, (2009), Selenium supplementation influences growth performance, antioxidant status and immune response in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, (153), 77–87.
34. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN, (2014). Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* 94, 739–777.
35. López GAG, Ramírez BJE, López AR, Revilla VA, Tórtora PJ, Bárcena GJR, (2012). Balance de selenio en corderos suplementados con selenio orgánico. *Universidad y Ciencia Tropico Humedo*, 28(2), 173–180.
36. López LA, Fernando AC, Lazarova Z, Bañuelos VR, Sánchez RSH, (2012). Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Rev. ANACEM*, 6 (1), 48-53.
37. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE, (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1957–1997.
38. Manzanares CW, (2007). Selenio en los pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica. *Nutricion Hospitalaria*, 22(3):295-306.
39. Mayor OR, (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 5 (2), 3-29.
40. McKenzie RC, Rafferty TS, Beckett GJ, (1998). Selenium: an essential element for immune function. *Immunol. Today* 19, 342–345.
41. Mishell BB, Stanley MS (1980). Selected Methods in Cellular Immunology. 1a. edición. WH Freeman and Co. USA, 219-224.
42. Molina CBA, Beltran TVE, (2014). Evaluación de la aplicación de selenio y vitamina e, sobre la fertilidad en ovejas bajo un protocolo de sincronización corto. Tesis (Licenciatura). Universidad Autónoma De Baja California Sur.
43. Mudgala V, Kumar GA, Sharan DR, Mayank R, (2018). Selenium and copper interaction at supra-nutritional level affecting blood parameters including

- immune response against *P. multocida* antigen in Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, (50), 415-423.
44. Müller AS, Pallauf J, Most E, (2002). Parameters of dietary selenium and vitamin E deficiency in growing rabbits. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 16(1), 47–55.
45. Olivares PR, Gómez CMA, Schwentesius RR, Carrera CB, (2009). Alternativas a la producción y mercadeo para la carne de conejo en Tlaxcala, México. *Región y Sociedad*, 21(46), 191-207
46. Papadomichelakis G, Zoidis E, Pappas AC, Mountzouris KC, Fegeros K, (2017), Effects of increasing dietary organic selenium levels on meat fatty acid composition and oxidative stability in growing rabbits. *Meat Science*, 131, 132-138.
47. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK, (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 775–806.
48. Puls R, (1988). Mineral levels in animal health diagnostic data. Sherpa International, *British Columbia*.
49. Rahmanto AS, Davies JM, (2012). Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants. *IUBMB Life*, 64(11), 863–871.
50. Ramírez BE, (2009). Suplementación de selenio en áreas deficientes de México. *Tecnologías En Apoyo a Ovinocultores*, 21–25.
51. Rao SVR, Prakash B, Raju MVLN, Panda AK, Poonam S, Murthy OK, (2013). Effect of supplementing organic selenium on performance, carcass traits, oxidative parameters and immune responses in commercial broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* (26), 247–252.
52. Rodríguez PG, (2015). Estudio del efecto de la suplementación de selenio sobre biomarcadores de estrés oxidativo en plasma de cabra. Tesis (Maestría). Universidad Nacional Autónoma De México.
53. Sarabia MM, (2004). Desarrollo de un bolo intraruminal de liberación prolongada con Se orgánico de levaduras para bovinos productores de leche.

- 128 f. Tesis (Maestría.) - Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
54. Segurola HG, Cárdenas LG, Burgos PR, (2016). Nutrientes e inmunidad. *Nutr Clin Med*, 10, 1–19.
55. Seyedali A, Berry MJ, (2014). Nonsense-mediated decay factors are involved in the regulation of selenoprotein mRNA levels during selenium deficiency. *RNA Publ. RNA Soc.* 20, 1248–1256.
56. Shekaro A, Oladele SB, Abdu PA, Ibrahim NDG, (2012). Effect of selenium on the susceptibility of vaccinated cockerels against infectious bursal disease. *J. Vet. Adv.* 2, 573–578.
57. Shewen PE, Wilkie BN. (1983). *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by typespecific rabbit antisera. *Am. J. Vet.* 44, 715.
58. Solanet J, Malena R; Estein SM, Estevao BS, Paolicchi FA, (2011). Desarrollo de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en carneros vacunados o infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis* *Revista Argentina de Microbiología*, 43, (1), 9-17.
59. Stoytcheva ZR, Berry MJ, (2009). Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790, 1429–1440.
60. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD, (2003). The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57(3), 134–144.
61. Velázquez GG, (2015). Efecto de la adición de selenio orgánico en la dieta de ovinos en finalización sobre las características fisicoquímicas, bioquímicas y microbiológicas de la carne. Tesis (Doctorado). Universidad Autónoma del Estado De México.
62. Villanueva CGJ, (2011). Nutrición del ganado: selenio. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1–3.
63. Vinchira JE, Muñoz RAP, (2010). Selenio: Nutriente objetivo para mejorar la composición nutricional del pescado cultivado. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57(1), 48–57.

64. Vladimirov YA, Proskurnina EV, (2009). Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochem. Moscow* 74, 1545–1566.
65. Zamora SJD, (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev. Chilena de Nutrición*, 34 (1), 0.
66. Zhang Y, Zhu S, Wang X, Wang Ch, Li F, (2011). The effect of dietary selenium levels on growth performance, antioxidant capacity and glutathione peroxidase 1 (GSHPx1) mRNA expression in growing meat rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 259–264.