

FECHA DE ADQUISICIÓN	
NUM. DE INVENTARIO	00114
PROCEDENCIA	
NUM. CALIFICACIÓN	
PRECIO	
INST.	

	SF375.6 .G72
TL00114	CID UAAAN UL Ej.1

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SELENIO
ORGÁNICO SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES DE OVEJAS**

POR:

DAPHNE LUCIA GRAHAM BOLLINGER

TESIS:

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México.

Febrero del 2006.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SELENIO
ORGÁNICO SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES DE OVEJAS**

POR:

DAPHNE LUCIA GRAHAM BOLLINGER

ASESOR PRINCIPAL

Una firma manuscrita en tinta negra que parece decir "Rafael Rodríguez Martínez".

DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Torreón, Coahuila, México.

Febrero del 2006.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SELENIO
ORGÁNICO SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES DE OVEJAS**

POR:

DAPHNE LUCIA GRAHAM BOLLINGER

ASESOR PRINCIPAL



DR. RAFAEL RODRIGUEZ MARTÍNEZ

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

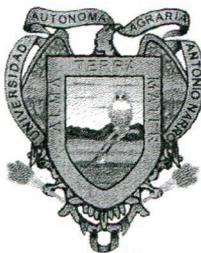
Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UE

Torreón, Coahuila, Mexico.

Febrero del 2006.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



PRESIDENTE DE JURADO

Rafael Rodríguez Martínez

DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL

Margarita Y. Mendoza Ramos

Q. B. P. MARGARITA Y. MENDOZA RAMOS

VOCAL

José Luis Corona Medina

M. C. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA

VOCAL SUPLENTE

Simón Alonso

M. V. Z. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO

Torreón, Coahuila, México.

Febrero de 2006.

AGRADECIMIENTOS

A mi ALMA TERRA MATER, por brindarme la oportunidad de 5 años maravillosos.

Al COECYT por el apoyo y la oportunidad de finalizar con éxito mis estudios.

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria (DGETA), de la Secretaría de Educación Pública, por el financiamiento al proyecto de investigación DGETA007.2005-UR600R047FN7SF02, de donde se originaron los datos para la elaboración de esta tesis.

A mis profesores por demostrarme que la carrera que elegí es la más maravillosa, y por sembrar en mi la perfección y la diplomacia.

A Altech de México, Distribuidora de Torreón, por proporcionar para este experimento Sel-Plex ®.

A mi mamá y mi abuelita, las dos mujeres más maravillosas que pude haber encontrado en esta vida. GRACIAS por estar siempre a mi lado!

A los que estuvieron, a los que están y a los que estarán...

DEDICATORIA

Dedico este "libro" a mi misma, a mi mamá y mi abuelita, por que es el primero de muchos otros.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
SISTEMA INMUNE.....	1
INMUNIDAD Y NUTRICION	3
ESTRÉS OXIDATIVO Y SALUD ANIMAL	7
Daño Oxidativo.....	9
Antioxidantes.....	11
NEUTRÓFILOS	13
Estructura de los neutrófilos.....	14
Cinética de los neutrófilos	15
EL SELENIO.....	17
Selenio como antioxidante	20
Demanda metabólica	21
ANÁLISIS DE LA FUNCION FAGOCÍTICA DE LOS NEUTROFILOS.....	23
El selenio y la función de los neutrófilos.....	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO	28
METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO	28
DEFINICIÓN DE LOS ANIMALES E INSTALACIONES.....	28
MUESTREO:	30
REACTIVOS	30
EQUIPO NECESARIO.....	31
PROCEDIMIENTO:	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	36
LITERATURA CITADA.....	36

INTRODUCCIÓN

Las interacciones entre la nutrición y el sistema inmune son diversas y de particular importancia para el bienestar y eficiencia en la producción de los animales. Por ejemplo, los animales enfermos tienen menos interacción social, lento crecimiento y pobre nivel de conversión, bajas ovulaciones y menos producción de leche. La comprensión de estas relaciones provee oportunidades para las intervenciones nutricionales que promueven el bienestar animal y la salud mientras mantienen las altas tasas de crecimiento y producción.

Mientras que la mayoría de las investigaciones dentro del campo de la nutrición e inmunidad han estado enfocadas en el uso de los nutrientes para modular la respuesta inmune, poca atención se ha dedicado a los requerimientos nutricionales del sistema inmunológico (Humphrey *et al.* 2002).

SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está compuesto por una variedad de células y órganos que interactúan para defender al cuerpo en contra de patógenos (Humphrey *et al.* 2002). La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones precoces de la inmunidad innata y por las reacciones tardías de la inmunidad adaptativa (Abbas *et al.* 2002).

La primera línea de defensa contra una infección es la inmunidad innata, casi todos los componentes de esta inmunidad se encuentran antes del inicio de la infección y constituyen un grupo de mecanismos de resistencia contra la enfermedad que no son específicos de un patógeno particular, sino que incluyen componentes celulares y moleculares, que reconocen clases de moléculas peculiares, a los patógenos que se encuentran con frecuencia (Department of Bacteriology).

Las células fagocíticas, como los macrófagos y los neutrófilos, las barreras como la piel, y una diversidad de compuestos antimicrobianos

sintetizados por el hospedero, tienen funciones importantes en la inmunidad innata, estas son las barreras de la inmunidad innata (anatómica fisiológica, fagocítica e inflamatoria) y este tipo de inmunidad involucra mecanismos generales en la salud animal, que previenen la colonización por los microorganismos y antagonizan o matan todo lo que entre al hospedero (Department of Bacteriology; Goldsby *et al.* 2004).

La inmunidad innata se conoce también como respuesta inespecífica, y es la defensa predominante durante las etapas tempranas de una infección. La respuesta inespecífica está presente o es rápidamente activada en el sitio de la infección por numerosos estímulos, sin embargo, no aumenta por exposición repetida al mismo daño. Recíprocamente, la respuesta inmune adquirida o específica reconoce determinantes específicos de un patógeno y así facilita la eliminación selectiva (Sordillo *et al.* 1997).

La inmunidad adaptativa es un componente específico el cual no actúa hasta que no existe un reto antigénico para el organismo, responde al desafío con un grado elevado de especificidad y, asimismo, con la propiedad notable de "memoria". De manera característica, se observa una reacción inmunitaria adaptativa contra un antígeno en el transcurso de 5 a 6 días después de la exposición inicial al mismo. La exposición al antígeno algún tiempo después, tiene como resultado una respuesta de memoria: la reacción inmunitaria al segundo reto ocurre en menos tiempo que la primera, es más potente y con frecuencia más eficaz para neutralizar y eliminar el patógeno. Los principales agentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos, los anticuerpos y otras moléculas que producen estas células (Goldsby *et al.* 2004).

El reconocimiento de factores patógenos es mediado por moléculas de anticuerpos, macrófagos y diversas poblaciones linfoides. Debido a la "memoria" de ciertos linfocitos, la respuesta inmune específica puede ser aumentada tras exposiciones repetidas a un mismo patógeno (Sordillo *et al.* 1997).

Una diferencia mayor entre la inmunidad adaptativa y la innata es la rapidez de la reacción inmunitaria de la última, que utiliza un repertorio

preexistente, pero limitado, de componentes reactivos. Por otra parte la inmunidad adaptativa compensa su inicio más lento con su capacidad para reconocer una amplitud mayor de sustancias extrañas y asimismo, con la posibilidad de mejorar durante una respuesta, toda vez que la inmunidad innata permanece constante. Cabe señalar que en grado considerable las respuestas adaptativas secundarias son más rápidas que las primarias (Goldsby *et al.* 2004).

INMUNIDAD Y NUTRICION

El sistema inmune compite mucho con los procesos de crecimiento y reproducción por los nutrientes y es un componente del costo de mantenimiento del animal. Se ha discutido acerca de los nutrientes más importantes que necesita el sistema inmune durante su activación y con el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune, lo cual constituye una pequeña porción del requerimiento nutricional en general. Sin embargo, la activación del sistema inmune resulta en una serie de cambios metabólicos y de comportamiento que afectan dramáticamente la disponibilidad de los nutrientes y pueden en última instancia, realzar la adquisición de nutrientes por el sistema inmune (Humphrey *et al.* 2002).

La deficiencia de micronutrientes tiene probablemente un efecto directo en el funcionamiento de las células inmunes. El efecto principal parece ser una reducción en el volumen celular que puede afectar indirectamente la función de las células inmunes, particularmente, cuando el número de linfocitos T se reducen. Existen contradicciones por el hecho de que las enfermedades pueden disminuir las concentraciones de micronutrientes en el plasma que se pueden malinterpretar como una deficiencia (Thurnham 1997).

El estado nutricional está directamente relacionado con la salud integral y se ha relacionado ampliamente a la nutrición apropiada con la capacidad de un animal para combatir enfermedades.(Sordillo *et al.* 1997)

La evaluación del estado nutricional de un animal depende de marcadores bioquímicos tales como los niveles plasmáticos, y el número de leucocitos, sin embargo, el uso de dichos marcadores puede sobrestimar el grado de deficiencia nutricional, particularmente si se acompaña de enfermedades, ya que tales enfermedades pueden disminuir las concentraciones de los nutrientes, como parte de los cambios que acompañan la fase aguda (Thurnham 1997).

La susceptibilidad de las vacas lecheras a las enfermedades infecciosas como la mastitis, es más alta durante la etapa de parto que en otras etapas. Los mecanismos de resistencia del hospedero se deprimen generalmente por aproximadamente 3 semanas antes del parto hasta 3 semanas después del mismo. Los mecanismos subyacentes y los factores no han sido totalmente explicados. Sin embargo, muchos cambios metabólicos y hormonales tienen lugar durante este periodo, lo cual puede contribuir al daño de la defensa inmune. Los cambios en la cantidad de células blancas son observados cerca del parto, por ejemplo un incremento en el número de neutrófilos circulantes. Los neutrófilos son considerados la primera línea de defensa celular contra los patógenos, pero durante el parto, sufren daño importantes funciones como la fagocitosis y migración (Meglia *et al.* 2001).

El estudio de los efectos de nutrientes específicos es complicado por la diversidad de las funciones y por las complejas interacciones con otros nutrientes, es por ello que los investigadores han podido definir más bien, el papel de varios micronutrientes en el proceso de infección e inmunidad debido a que se ha demostrado que varias de estas sustancias y sus deficiencias tienen profundos efectos en el sistema inmune de varios animales (Sordillo *et al.* 1997).

Muchas deficiencias en micronutrientes deprimen el crecimiento del tejido mieloide y alteran la inmunocompetencia, no está claro si los efectos se deben a una disminución de células inmunológicas o a un daño en estas. (Thurnham 1997; Meglia *et al.* 2001).

El estado nutricional de los animales ha sido asociado con su capacidad para reducir infecciones (Thurnham 1997). El cobre, zinc y hierro, como algunos otros elementos traza, son esenciales para la actividad de importantes enzimas fisiológicas que funcionan como un catalizador en la constitución de fluidos y tejidos (Kleczkowski *et al.* 2004). Se cree que la participación del selenio, zinc, hierro, cobre participan en la selección, maduración y activación de eventos de células inmunes que se han comprobado con las herramientas disponibles en biología celular analítica, en genética molecular y tecnología (Failla 2003).

Reportes han mostrado que hay una depresión en los niveles sanguíneos de calcio, zinc, magnesio, fósforo, potasio, selenio, y las vitaminas A y E durante el periodo del parto. Varios de estos nutrientes son importantes para el sistema inmune. El incremento de la incidencia de mastitis fue reportado en vaquillas cuando las concentraciones de vitamina A y E fueron bajas (Thurnham 1997).

Las deficiencias de cobre en vacas y ovejas han mostrado como resultado una baja actividad bactericida de los leucocitos sanguíneos (Meglia *et al.* 2001).

cobre, zinc y selenio son los elementos traza más importantes ya que toman parte en la formación de mecanismos antioxidantes en el ganado (Kleczkowski *et al.* 2004).

Por encima de los análisis, parece claro que el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune necesita una significativa proporción de requerimientos nutricionales y el desafío infeccioso resulta en un repentino e importante incremento de la demanda de nutrientes. Por lo tanto, el sistema inmune posee la habilidad para regular esta adquisición de nutrientes de acuerdo al estado fisiológico del animal (Humphrey *et al.* 2002).

Conociendo con precisión los requerimientos del sistema inmune para cada nutriente se proveería una mejoría importante en los campos del bienestar y producción animal. Primero, conociendo los requerimientos nutricionales del desarrollo del sistema inmune para permitir el suministro suficiente de nutrientes para la adecuada expansión de varias líneas de células

linfocíticas y fagocíticas durante la embriogénesis y varias semanas después del nacimiento. Segundo, los conocimientos de los requerimientos nutricionales de mantenimiento ayudarían a sostener la pérdida de varias poblaciones de células inmunes y respectivamente la producción de macromoléculas. Finalmente, el conocimiento de los requerimientos nutricionales para obtener una respuesta inmune de protección ayudaría al animal en función de minimizar las ineficiencias y patologías asociadas con el aumento de una insuficiente respuesta inmune (Humphrey *et al.* 2002).

Existe evidencia de que algunos tipos celulares y actividades realizadas parecen ser particularmente sensibles a deficiencias marginales o moderadas de elementos traza en particular la deficiencia de un número de elementos traza alteran la secreción de factores extracelulares que ajustan las actividades de células inmunológicas y otro tipo de células que participan en la respuesta del huésped a agentes irritantes e infecciones. Se ha demostrado que los cambios en el ambiente Intracelular que son provocados por alteraciones en el estado de micronutrientes (elementos traza) pueden influenciar directamente por la virulencia y en adición pueden provocar un trastorno en el sistema inmune (Failla 2003).

También durante el estrés oxidativo se ha sugerido una inadecuada respuesta inmunológica. Las dietas altas en grasas insaturadas, las cuales han sido grandemente reconocidas como contribuyentes al estrés oxidativo también reducen la inmunocompetencia. La inmunidad es reducida por la inadecuada cantidad de elementos traza, incluyendo cobre, hierro, zinc, y la vitamina E, y C, todos son requeridos para la defensa antioxidativa. Las infecciones y la reparación de tejidos es común en el constante manejo de los rebaños lecheros, y las vacas pueden experimentar algunos grados de respuesta inmune especialmente después del alumbramiento. El estrés, las enfermedades y la inducción de la respuesta inmune incrementan los requerimientos de los nutrientes, incluyendo vitaminas y elementos traza esencial. La cantidad inadecuada de estos nutrientes requeridos para ambas defensas inmune y antioxidante puede alterar la función de ambos sistemas (Miller *et al.* 1993).

El consumo de alimento disminuye bajo estrés y se reduce la ingesta de micronutrientes inmunologicamente importantes, incluido selenio y las vitaminas A, E. El selenio, la peroxidasa glutatiónica y la vitamina E son antioxidantes que protegen a las células y a los tejidos del ataque oxidativo por los radicales libres, que se liberan durante el estallido respiratorio asociado con la eliminación de bacterias por neutrófilos y macrófagos. Se ha demostrado que la suplementación con selenio, o vitamina E, y ambos, eleva la función de los neutrófilos en rumiantes. La mejora en la competencia inmune en animales estresados por manipulación nutricional, es posible, y sería de gran valor en producción animal (Katamoto *et al.* 1998).

A pesar de los cambios en los nutrientes y el medio hormonal durante la infección, el sistema inmune debe obtener los nutrientes necesarios en el tiempo adecuado y adicionarlos para combatir con éxito la infección. Si bien los nutrientes requeridos por estos procesos no están exactamente determinados, actualmente los nutricionistas formulan dietas con la esperanza de que las dietas no solo proporcionen el crecimiento potencial máximo, sino también proporcionar niveles óptimos de nutrientes para el desarrollo, mantenimiento y respuestas del sistema inmune (Humphrey *et al.* 2002).

ESTRÉS OXIDATIVO Y SALUD ANIMAL

Para los organismos que viven en un medio ambiente anaerobio la exposición a especies oxígeno reactivas (ROS por sus siglas en inglés) es continua e inevitable. Estas son generadas intracelularmente a través de una variedad de procesos, por ejemplo, como productos de un metabolismo normal aeróbico o como un segundo mensajero transductor de varias señales. Las trascendentes fluctuaciones en las ROS tienen gran importancia en las funciones regulares pero cuando presentan niveles altos y/o sostenidos, las ROS pueden causar severos daños al DNA, proteínas y lípidos (Martindale y Holbrook 2002).

El estrés oxidativo se manifiesta por un desequilibrio en la producción de las especies oxígeno reactivas y/o en la discapacidad de los antioxidantes de defensa endógenos que está relacionado con el envejecimiento así como con enfermedades severas como el cáncer, la artritis, la arterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades renales, uremia, Alzheimer, Parkinson, el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA), inflamaciones pulmonares, etc. (Kleczkowski *et al.* 2002; Georgieva 2005).

Muchas clases de enfermedades infecciosas causan también estrés oxidativo por la vía de activación lenta de las células fagocíticas (Kleczkowski *et al.* 2002).

Las vías de las señales de transducción están involucradas en la regulación de la respuesta celular al estrés y en particular al estrés oxidativo (Martindale y Holbrook 2002).

Los lipopolisacáridos microbianos producen las ROS y el óxido nítrico en los macrófagos. Estas moléculas están involucradas en la inflamación asociada con el choque endotóxico (Kim *et al.* 2004).

Los neutrófilos desarrollan su efecto bactericida a través del "estallido respiratorio" que producen radicales hidroxilo y radicales del oxígeno, que son componentes clave de los mecanismos asesinos dependientes del oxígeno (Sordillo *et al.* 1997).

La fagocitosis mediada por los receptores estimula a los neutrófilos para consumir grandes cantidades de oxígeno molecular, habilitando a las células para sufrir un estallido respiratorio masivo que desencadena una carga de ROS sobre la superficie y la bacteria fagocitada (Burton y Erskine 2003).

Un número de sistemas de defensa están involucrados para combatir la acumulación del ROS. Estos incluyen varias moléculas no enzimáticas (por ejemplo: vitamina A, C y E y los Flavenoides) así como carroñeros enzimáticos del ROS por ejemplo superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. Desafortunadamente estos mecanismos de defensa no son siempre adecuados para contraatacar la producción del ROS provocando que esto termine en un estado de estrés oxidativo. El estrés oxidativo ha sido

implicado en una amplia variedad de procesos patológicos incluyendo arteriosclerosis, diabetes, fibrosis pulmonar, desordenes neurodegenerativos y artritis y se cree que es un factor importante en el envejecimiento (Martindale y Holbrook 2002).

En el ámbito celular, un daño oxidativo demuestra un amplio espectro de rango de respuestas que pueden ir desde proliferación y detención del crecimiento, envejecimiento, hasta muerte celular. El resultado particular observado puede variar significativamente de un tipo de célula a otra, así mismo con respecto al agente examinado su dosificación y/o duración del tratamiento. Algunos de los caminos están claramente relacionados con la sobrevivencia, mientras otros, están asociados con la muerte celular. En bajas concentraciones las ROS son esenciales para múltiples procesos fisiológicos normales de diferenciación celular, apoptosis, y respuesta inmune mediada por células en contra de microorganismos. Recientemente, las ROS han cobrado una particular atención, porque se supone que están involucrados en complicaciones de procesos patológicos y en efectos adversos con un significado desconocido (Georgieva 2005).

La modulación de las vías que están involucradas en una mediación de la respuesta celular para el daño oxidativo ofrecen oportunidades de intervenciones terapéuticas únicas dirigidas al tratamiento de condiciones o enfermedades, como el envejecimiento, donde el estrés oxidativo es un factor importante. Cuando la producción de las ROS excede la capacidad de desintoxicación del sistema de defensa antioxidante endógeno de los sistemas biológicos sobreviene el estrés oxidativo. El decremento en la actividad de enzimas antioxidantes puede tener un dramático efecto sobre la resistencia de las células inducidas al daño oxidativo y sobre la tasa de muerte celular. Sobre todo en procesos de daño por radicales libres en las células el cual es llamado estrés oxidativo. Los radicales libres son partículas paramagnéticas, que poseen uno o más electrones con orbitales incompletos en algunos de ellos en orbitas electrónicas externas (Martindale y Holbrook 2002).

Daño Oxidativo

Los radicales OH^\cdot son extremadamente reactivos atacan lípidos, proteínas, polisacáridos, DNA y otras macromoléculas. La naturaleza del daño depende de la localización de los complejos metálicos dentro del organismo que promueve la formación de OH^\cdot . Las moléculas oxidadas sacan electrones de otras moléculas, dando como resultado, una reacción en cadena. Esta reacción, si no es controlada puede causar un daño extendido a los tejidos, con lo cual se puede afectar la permeabilidad de la membrana, la función enzimática, e incluso dañar el tono muscular. La relativa deficiencia total de antioxidantes puede contribuir a la deficiente contractibilidad uterina, ya que disminuye el transporte de espermatozoides al óvulo en ovejas y vacas (Georgieva 2005).

Los radicales de oxígeno y sus productos de reacción colectivamente referidos como (ROS), son producidas como una consecuencia de la actividad de la oxidasa de la NADPH la cual bombea superóxido dentro de la vacuola fagocítica. El lugar mejor conocido de la formación de las ROS es la mitocondria en los monocitos y los neutrófilos. La molécula de la monoamino oxidasa necesita un donador de electrones tal como NADH o NADPH con H^+ y es responsable de la oxidación de xenobioticos dando como resultado la formación de ROS (Miller *et al.* 1993).

Algunas ROS son producidas endógenamente por procesos metabólicos normales, pero la cantidad puede incrementarse marcadamente por factores exógenos, incluyendo la radiación solar, toxinas fungicidas (de hongos), y pesticidas. Para los organismos que viven en un ambiente aerobio la exposición a ROS es continua e inevitable. La oxidación de las proteínas por las ROS resulta en una modificación de un lado los grupos de los aminoácidos, la degeneración oxidativa de las uniones peptídicas o la formación de uniones covalentes con productos oxidados de lípidos o carbohidratos. (Miller *et al.* 1993; Georgieva 2005)

Las ROS acompañadas de una variedad de metabolitos parcialmente reductores de oxígeno (por ejemplo aniones superóxidos, peróxidos de hidrógeno y radicales hidroxilo), poseen reactividad más alta que el oxígeno

molecular. Estas son generadas intracelularmente a través de una variedad de procesos, por ejemplo, como mensajero transductor de varias señales de las vías, ellos también pueden ser derivados de fuentes exógenas o producirse como una consecuencia de la exposición de las células a algún daño del ambiente. (Georgieva 2005)

Los lipopolisacaridos inducen la peroxidación de los lípidos y la formación de peróxido de hidrógeno, estos efectos pueden ser prevenidos por la adición de antioxidantes (Martindale y Holbrook 2002).

Los metabolitos oxígeno reactivos generados durante el metabolismo normal y el estimulado por xenobioticos pueden entrar en una reacción que cuando es incontrolada puede debilitar el rendimiento diario de los animales. Los efectos directos incluyen los cambios peroxidativos en las membranas y otros componentes celulares. Indirectamente el consumo competitivo de equivalentes reductores pueden interferir con importantes funciones metabólicas y desviar la glucosa a otros caminos induciendo la vía del monofosfato (Kim *et al.* 2004).

Cuando las ROS no son removidas segura y efectivamente, el estrés oxidativo puede debilitar la salud en las vacas lecheras ya sea de manera directa o indirecta. Los efectos directos incluyen daño peroxidativo hacia importantes lípidos y macromoléculas. Indirectamente los cambios inducidos por las ROS en las membranas celulares y sus componentes pueden modificar las vías metabólicas, dando como resultado alteraciones fisiológicas y posibles alteraciones patológicas. Las ROS son productos indeseables de un proceso metabólico normal y no siempre son dañinas. El superóxido (O_2^-), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), están involucrados fisiológicamente en la química de varias enzimas y son usados por células fagocíticas para matar bacterias. El desequilibrio entre la producción de ROS y su desecho, puede iniciar una cadena de reacciones oxidativas y peroxidación de lípidos. (Miller *et al.* 1993)

Antioxidantes

Las deficiencias en las sustancias naturales protectoras o el exceso en la exposición a estimuladores productores de ROS puede dar como resultado un estrés oxidativo, lo cual ocurre cuando los pro-oxidantes exceden la capacidad de los antioxidantes. (Miller *et al.* 1993)

Los antioxidantes son compuestos químicos que reducen los radicales de aniones superóxidos formando peróxido de hidrógeno, el cual, a su vez sufre una rápida descomposición por las catalasas y peroxidasas. (Miller *et al.* 1993)

El estado antioxidante consiste de dos mecanismos: el enzimático y no enzimático. El mecanismo no enzimático se compone de antioxidantes emigrantes de radicales libres, iones metálicos, sequestradores de iones metálicos de transición, albúminas, celuroplasma y melatonina. En el otro lado el mecanismo de las enzimas se compone de la SOD, peroxidasa, catalasa y reductasa. La actividad de estos mecanismos depende mucho de la presencia de elementos traza como el cobre, molibdeno, zinc, manganeso, hierro, selenio y silicio. (Kleczkowski *et al.* 2003)

Las células contienen un número de defensas antioxidantes para minimizar las fluctuaciones en ROS, pero la generación de ROS con frecuencia excede la capacidad de antioxidantes de las células dando como resultado una condición de estrés oxidativo terminal. La supervivencia del hospedador depende de la habilidad de las células y tejidos para adaptarse o resistirse al estrés, y reparar o remover las moléculas o células dañadas. Numerosos mecanismos de respuesta al estrés tienen como objeto evolucionar, y son rápidamente activados en respuesta del ataque oxidativo. Algunos de los caminos son preferentemente un vínculo para realzar la supervivencia, mientras otros son más frecuentemente asociados con muerte celular. Otros pueden estar implicados en ambos extremos dependiendo de particulares circunstancias. Estos senderos constituyen importantes caminos para las intervenciones terapéuticas dirigidas a limitar el daño oxidativo o atenuar sus secuelas (Kleczkowski *et al.* 2003).

Existe evidencia de que la selenoproteína P tiene una función como antioxidante, protegiendo células endoteliales de moléculas oxidativas (Martindale y Holbrook 2002).

El glutatión (GSH) es un antioxidante intracelular muy importante con múltiples funciones biológicas, incluyendo el mantenimiento de proteínas y la reducción de muchas otras actividades biológicas moleculares (Burk *et al.* 2003). Forma parte importante de la enzima glutatión peroxidasa, que utiliza selenio para prevenir el daño oxidativo de los tejidos corporales (Kim *et al.* 2004).

Una parte importante de la enzima glutatión peroxidasa, son las funciones del selenio de prevenir el daño oxidativo en el daño de los tejidos corporales (Gunter *et al.* 2003).

Normalmente el cuerpo esta protegido por un amplio rango de sistemas de antioxidantes trabajando en conjunto. Los catalizadores metálicos de las reacciones oxidativas son eliminados en los fluidos extracelulares por macromoléculas atraparoras de metales. Las SOD, la GSH y la catalasa dentro de las células remueven el superóxido y los peróxidos antes de que ellos reaccionen con metales catalíticos para formar especies mas reactivas. Finalmente la cadena de reacciones peroxidativas iniciadas por especies reactivas que escaparon de la degradación enzimatica son terminadas por la cadena de antioxidantes incluido el ascorbato, glutatión peroxidasa, urea y vitamina E liposoluble, la ubiquinona y los β -carotenos. Para optimizar el rendimiento en vacas altamente productoras debe ser controlado el estrés oxidativo con suplemento de nutrientes bien conocidos como antioxidantes y para minimizar los efectos de la sustancias que estimulan los metabolitos oxigeno reactivos. (Miller *et al.* 1993)

NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos proveen la primera línea de defensa del sistema inmune innata ya sea fagocitando, matando y digiriendo a las bacterias y los hongos. Previamente se creía que el matar se lograba por los radicales libres del

neutrófilos unen las inmunoglobulinas y los complementos en la circulación. Algunas ligaduras limitantes son removidas y nuevos receptores de inmunoglobulinas y complementos son expresados durante la diapédesis. Así, el interferón-gamma, y las células T derivadas de la citoquina secretada en respuesta a la inflamación induce a un doblaje del 4.5 en los receptores de IgG2. Así, los neutrófilos tienen más receptores para una mayor eficiencia en el reconocimiento de las bacterias opsonizadas, dando como resultado una ingestión y eliminación más rápida de los patógenos invasores. Durante la fagocitosis de patógenos, los gránulos citosólicos se funden con la invaginación de la membrana plasmática como parte del fagolisosoma, dentro del cual se liberan los contenidos, de ese modo se crea y aumenta la toxicidad del microambiente. (Paape y Capuco 1997)

Los neutrófilos son esenciales para la resistencia a las infecciones bacterianas y fúngicas. Una severa neutropenia conduce invariablemente a la infección por medio de un vasto tipo de organismos, la mayoría de los cuales no son normalmente patógenos, aun en enfermedad de granulomatosis crónica. (Segal 2005)

Estructura de los neutrófilos

La estructura de leucocitos PMN ha sido cuidadosamente definida, la célula esta delineada por una membrana plasmática que tiene un numero de receptores funcionales importantes, que incluyen la L-selectina y B2-integrina moléculas de adherencia asociadas a la unión de PMN y células endoteliales las cuales son importantes para emigrar hacia los sitios de infección. Los receptores de membrana para el componente Fc (fracción fijadora de complemento) de la clase de inmunoglobulinas IgM e IgG y componente del complemento C3b son necesarios para mediar la fagocitosis de las bacterias invasoras. La muerte o apoptosis de PMN expresa receptores que los marca para una disposición rápida por parte de los macrófagos (Paape *et al.* 2002).

La característica más predominante de los PMN es su núcleo multilobulado este es importante porque permite alinear sus lóbulos nucleares en una línea delgada, permitiendo una migración rápida entre las células endoteliales. Dentro del citoplasma hay islas de glicógeno que constituye el 20% de la célula en una base de peso seco y la membrana limita los numerosos gránulos que son usados por la célula para matar a las bacterias (Paape *et al.* 2002).

Como en otras especies los PMN de borregos contienen gránulos azurofílicos específicos, contienen además un tercer nivel de gránulos más largos, densos y más numerosos que los otros dos gránulos, estos gránulos contienen lactoferina que también se encuentra en los gránulos específicos, pero ellos no contienen a los constituyentes comunes de gránulos azurofílico, esta tercera clase de gránulos contienen un grupo de proteínas altamente cationicas y es el almacén exclusiva de los poderosos compuestos bactericida independientes de oxígenos. El mecanismo antibacteriano mas importante derivado de los gránulos azurofílicos es la hidromieloperoxidasa y el sistema de haluro de peróxido (Paape *et al.* 2002)

Cinética de los neutrófilos

El ciclo de vida de los PMN es corto, en la medula ósea, estas células requieren 10-14 días para madurar, después de la maduración pueden ser acumulados por algunos días adicionales, los PMN maduros abandonan el compartimiento hematopoyético de la medula ósea y entran al seno vascular para viajar vía canal de emigración a través del endotelio, los PMN deambulan en la circulación sanguínea brevemente (8.9 h vida media) abandonando la circulación por diapédesis entre las células endoteliales entrando en los tejidos, donde funcionan como fagocitos por 1-2 días, en los animales saludables, la producción y destrucción de PMN es regulada intensamente, con lo cual se mantiene el numero constante en sangre, leche y tejidos (Paape *et al.* 2002).

La vida prolongada de los PMN es limitada por la apoptosis. Los macrófagos rápidamente atrapan y fagocitan los PMN apoptóticos, de ese

modo minimizan la liberación de contenidos granulares de los PMN que dañan a los tejidos (Paape *et al.* 2003).

Los antígenos de las bacterias ingeridos son procesados dentro de los macrófagos y aparecen en la membrana asociados con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II, estas son moléculas polimórficas que se requieren para que los linfocitos puedan reconocer a los antígenos extraños (Sordillo *et al.* 1997).

Una vez que los invasores son detectados, los macrófagos ponen en libertad mensajeros químicos, llamados quimio-atrayentes que causan la migración directa del PMN dentro de la infección. Los ligandos específicos en la superficie de los neutrófilos son requeridos para dirigir la migración y la fagocitosis. En respuesta a la infección, nuevas migraciones de leucocitos expresan un gran número de receptoras celulares de superficie para inmunoglobulinas y complemento y son más fagocíticas que sus contrapartes en sangre (Paape *et al.* 2000).

La iniciación de la actividad de la NADPH oxidasa, la degranulación coincide con una fase posterior de aproximadamente 20 s. Esto ocurre después del cierre de la vacuola y es limitada a la membrana plasmática encerrando la membrana vacuolar. Así pues, el superóxido no puede ser detectado en el exterior de una célula fagocítica. A menos que el envolvimiento sea frustrado por medio de un exceso abrumador de partículas y la clausura vacuolar se haga imposible. (Segal 2005)

El proceso de opsonización, aunque no esencial para la fagocitosis, promueve la fijación de la bacteria por los PMN, el reconocimiento inmunológico es llevado a cabo principalmente por anticuerpos específicos (IgM e IgG) que reconocen la bacteria a través de regiones Fab y se unen a PMN vía receptores Fc en la membrana plasmática de PMN, la diapédesis es también un efecto ligado a inmunoglobulinas de la superficie de los PMN (Paape *et al.* 2002).

Los neutrófilos producen radicales derivados del superóxido para tomar parte en la matanza de los microbios. A pesar de que la deficiencia de selenio

no afecta el número de neutrófilos en un rango de especies, hasta cierto punto algunos aspectos de dichas funciones son defectuosas. Solo los neutrófilos de animales selenio saturados pueden seguir produciendo continuamente los radicales después de 10 minutos y durante 45 minutos aproximadamente. La habilidad para continuar produciendo radicales depende del decremento del estatus de selenio y la actividad de la glutatión peroxidasa en los neutrófilos. Las funciones selenio dependientes de los compartimentos intracelulares son reguladas por la capacidad de las células inmunes para matar organismos ingeridos (Arthur *et al.* 2003).

La fagocitosis mediada por los receptores estimula a los neutrófilos para consumir grandes cantidades de oxígeno molecular, habilitando a las células para sufrir un estallamiento respiratorio masivo que desencadena una carga de ROS sobre la superficie y la bacteria fagocitada. (Burton y Erskine 2003)

EL SELENIO

El Selenio como elemento traza biológicamente esencial, es capaz de ejercer múltiples acciones en el sistema endocrino, y modular las funciones de muchas proteínas de regulación involucradas en la transducción de señales y afectar una variedad de actividades celulares, incluyendo el crecimiento y sobrevivencia celular (Kim *et al.* 2004; Beckett y Arthur 2005).

Es ampliamente reconocido que los elementos traza (como el Se) son requeridos para la diferenciación, activación y ejecución de las numerosas funciones de las células inmunes. El selenio modula la función inmune y una variedad de respuestas celulares como son proliferación, sobrevivencia y muerte. El selenio influye tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa en el sistema inmune (Arthur *et al.* 2003; Failla 2003; Kim *et al.* 2004).

El selenio es un elemento traza esencial para la salud de los mamíferos, que influye en la inmunidad, crecimiento de tumores, función muscular y neuromuscular y fertilidad. Recientemente, en humanos, se ha demostrado el potencial del selenio forma de "levadura de selenio" como agente cancerígeno

en niveles supranutricionales (200 $\mu\text{g Se}$) en forma de levadura de selenio en humanos. La "levadura de selenio" provee este en forma orgánica (principalmente como L-seleniometionina) la cual se considera una forma más segura y efectiva, de incorporar el selenio a la proteína tisular.

Las proteínas de la leche, caseína y las proteínas del suero son la mayor fuente de aminoácidos con azufre la proteína de leche es rica en cisteína un 2-3% y concentradas en 2.1%, proporcionando un vehículo útil en selenoproteína para enriquecer la dieta ya que la selenometionina no es incorporada específicamente dentro de las proteínas en lugar de metionina. La selenometionina es una forma de suplementar animales y humanos debido a que el selenio se presenta en los alimentos y se almacena en las proteínas corporales (McIntosh y Royle 2002).

La bioquímica celular del selenio es un sistema complejo que implica la expresión de un rango muy amplio de proteínas contenedoras de selenio, muchas de las cuales aun no han sido caracterizados (Arthur *et al.* 2003).

A comparación de los no rumiantes, los rumiantes absorben pobremente el selenio de sodio, esta diferencia es en gran parte debida al ambiente altamente reducido del rumen, el cual convierte parcialmente los componentes del Se insoluble en selenio elemental o selénidos (Gunter *et al.* 2003).

El selenio esta ampliamente distribuido en el ambiente (agua, sólidos, aire) aunque en bajas concentraciones ($<1\mu\text{g/g}$). El selenio generalmente se encuentra en el norte y sur de América, Canadá, Colombia, México Australia, Nueva Zelanda, Bulgaria, Alemania, y Mediterráneo algunas aguas reportan concentraciones más elevadas en el canal de Colorado o agua subterránea de región de Orks. El selenio es un compuesto que ha alcanzado aplicaciones tecnológicas en electrónica (para producir semiconductores, rectificadores y fotocélulas), en la maquinaria industrial (para obtener elevados grados de acero) en las industrias químicas y de vidrio, como catalizadores en la industria de caucho (para elevar la vulcanización), en farmacias (para preparar tratamientos veterinarios de enfermedades por deficiencia) y en la agricultura,

los compuestos orgánicos del selenio se usan como bactericidas fungicidas y herbicidas (Bem 1981).

Los depósitos de selenio en los tejidos musculares probablemente retienen selenio que no es muy rápidamente disponible para la asimilación metabólica a menos que el catabolismo muscular tenga lugar. El crecimiento de los animales de esta manera parece que puede hacer algo para evitar nuevamente la selenosis cuando la fuente de selenio orgánico ha sido proporcionada como resultado de un almacenamiento de este en los tejidos corporales (Kim y Mahan 2001).

La deficiencia de selenio en los animales es responsable de una serie de condiciones patológicas. Existen diversas enfermedades que se encuentran bajo la sospecha de ser inducidas o relacionadas con la deficiencia del mismo, tales como la miodistrofia nutricional, las retenciones placentarias y las condiciones patológicas de las deficiencias de selenio como son la infertilidad, los abortos, los partos prematuros, quistes ováricos y metritis (Serdaru *et al.* 2004).

En ovejas la deficiencia de selenio puede inhibir la respuesta de la IgG para cambios en vivo con glóbulos rojos y la destoxicación de ciertas toxinas (Gunter *et al.* 2003).

Los papeles biológicos asociados al selenio incluyen la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y mutación viral. Además, los elementos traza son esenciales para una función endocrina e inmune óptima y para moderar la respuesta inflamatoria. (Beckett y Arthur 2005)

La disponibilidad de selenio es influenciada por la composición de la dieta (Koenig *et al.* 1997). En bajos niveles es esencial para la síntesis de selenio-enzimas, pero niveles altos son tóxicos y son perjudiciales para el organismo por las reacciones metálicas con grupos esenciales de enzimas (Kim *et al.* 2004).

La toxicidad del selenio es alta, y la administración en forma orgánica e inorgánica resulta en varias formas de cáncer, en 1970 se asocio con carcinoma hepático, incluido de esta forma en la lista de los poco agentes

inorgánicos carcinogénicos, además los compuestos de Se causan cirrosis, alopecia perdidas de piezas dentales y parálisis. La concentración máxima que fue permitida en agua y residuos en líquidos fue establecida por OMS de $10 \mu\text{l}$, las concentraciones de $5 \mu \text{ Se/g}$ en alimento y $5 \mu \text{ Se/g}$ en leche y agua causan daño potencial en humanos. A pesar del efecto toxico ya conocido de este elemento no se le ha conocido como contaminante a largo plazo. Esta situación cambio después de incluirlo en la lista de carcinogénicos. Desde entonces muchos estudios parecían dedicados a determinación de Se en el ambiente y en el material biológico (Bem 1981)

La sobre carga o deficiencia de elementos traza, suprime la función de las células inmunes y aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad debido a enfermedades infecciosas (Failla 2003).

Selenio como antioxidante

Los efectos antioxidantes y otros beneficios del selenio han sido reconocidos desde hace algún tiempo. El selenio regula las funciones en el crecimiento y muerte celulares y modula las señales de transducción en varias células (Kim *et al.* 2004).

Los efectos antioxidantes del selenio se ha sugerido que son mediados por la glutatión peroxidasa como removedor potencial del daño en los hidroperoxidos lipídicos y el peroxido de hidrógeno (Arthur *et al.* 2003).

Ha sido sugerido que las selenoproteína P protege en contra del daño oxidativo y transporta el selenio del hígado a los tejidos periféricos (Burk *et al.* 2003).

La selenoproteína P es cuantitativamente la mejor selenoproteína en el plasma y tiene funciones tanto oxidantes como transportadoras. Ya que estas incorporan co-translacionalmente al selenio como un residuo de selenocisteína que está completamente ionizado al pH fisiológico y actúa como un eficiente catalizador oxidante (Beckett y Arthur 2005).

El selenio puede actuar como antioxidante en el espacio extracelular, el citosol celular, en asociación con las membranas celulares y específicamente

las del tracto gastrointestinal, todas con potencial para influir en el proceso inmune (Arthur *et al.* 2003).

Los múltiples roles que las selenoproteínas juegan en las células señalando sistemas y modificando la respuesta inmune, el crecimiento y sobrevivencia celular sugieren que hay más roles esperando ser descubiertos para el selenio en el sistema endocrino. El selenio también puede tener un papel en el tratamiento de males que dan respuesta a la manipulación endocrina. Por ejemplo el selenio es efectivo reduciendo el cáncer de próstata posiblemente por la inhibición del crecimiento de células tumorales por la vía de baja regulación de la expresión de receptores de andrógenos (Beckett y Arthur 2005).

El selenio es un componente de las selenoproteínas como glutatión peroxidasa selenio dependiente (Se-GP-x) y la tio-redoxina reductasa. El selenio es un constituyente esencial de GP-x, y juega un rol muy importante en el ROS emigrante (Kim *et al.* 2004).

Otras selenoproteínas están incluidas en muchos otros aspectos del metabolismo celular, el cual incrementa el potencial para reconocer los efectos adversos del selenio por encima de estos causados por sistemas antioxidantes. Así en la vía de las selenoproteínas, el selenio puede influenciar tres amplias áreas de la función celular a causa de las actividades antioxidantes, el metabolismo de la hormona tiroides y la regulación de la actividad de las proteínas redox- activas (Arthur *et al.* 2003).

Demanda metabólica

Si bien la demanda metabólica de algunos nutrientes puede incrementarse durante algunos estados infecciosos, la baja productividad durante estados infecciosos resulta en una disminución en la utilización de los nutrientes esenciales. Por ejemplo, el total de los requerimientos de lisina para el crecimiento disminuye durante un simulacro de un reto infeccioso en el crecimiento de cerdos y pollos, presumiblemente debido a la disminución en la

utilización de la lisina por el aumento del músculo, es más grande que el incremento necesario por el proceso anabólico de la respuesta inmune (Humphrey *et al.* 2002).

Investigaciones del último cuarto del siglo veinte establecieron la importancia de la nutrición con elementos traza para la protección de infecciones tanto en animales como en humanos, se ha catalogado el impacto de deficiencias provocadas por elementos traza y además de los genéticos, en el número de actividades efectuada en varias clases de leucocitos sanguíneos, medula y órganos linfoides. El selenio, fierro, cobre han recibido mayor atención. Ya que un suministro inadecuado de estos elementos esenciales se asocian a una supresión de numerosas actividades celulares en el sistema inmune, las alteraciones observadas pueden reflejar que cualquiera de estos, disminuye la actividad de las células individuales, una disminución en el número total de células efectoras en uno o más tejidos o en combinación de menos células habiendo disminuido la capacidad con cada célula, la amplitud del sistema inmune deteriorado, debido a una deficiencia de elementos traza que puede ser suficiente para incrementar el riesgo de la mortalidad y morbilidad debido a infecciones virales, microbianas y parasitarias, si cambia la deficiencia de los elementos traza se restablece la inmunocompetencia (Failla 2003).

Los metabolitos de oxígeno son removidos en una combinación de sistemas. Varios nutrientes esenciales están involucrados en la manufactura de la estructura conocida de componentes de defensa antioxidante. Quelantes Metálicos, ubiquinona, urato, GSG y ascorbato pueden ser parte de la dieta diaria o de origen exógeno, pero la dieta también debe contener una cantidad adecuada de nitrógeno, azufre y energía. La dieta diaria esencial requiere elementos en pequeñas cantidades para las enzimas antioxidantes e incluye magnesio, cobre y zinc para la SOD, Se para la glutatión peroxidasa, hierro para la catalasa, y hierro más molibdeno para la aldehído deshidrogenasa. Ciertos elementos de transición coordinados con bajo peso molecular como ligantes orgánicos también pueden imitar la actividad SOD (Meglia *et al.* 2001).

La selenoproteína P es un buen marcador de selenio en el estado nutricional. La deficiencia de selenio es causada al disminuir la concentración de selenoproteína P y la concentración del selenio en plasma al disminuirla cerca de 8 µg /dL (Burk *et al.* 2003).

ANÁLISIS DE LA FUNCION FAGOCÍTICA DE LOS NEUTROFILOS

La fagocitosis y las actividades neutrofilas bactericidas son importantes componentes de la inmunidad celular para las infecciones microbianas. La fagocitosis es promovida por opsoninas, particularmente anticuerpos específicos y ciertos componentes complementarios. La fagocitosis y las actividades microbicidas de los neutrófilos pueden ser diferentes para varios microorganismos. Los eventos fagocíticos estimulan los procesos metabólicos en los neutrófilos llevándolos a la activación de mecanismos microbianos oxígeno- dependientes y oxígeno independientes (Silva y Jain 1988).

Durante el curso de una infección natural en un individuo con una función neutrofila normal, el organismo infectante sufre una fagocitosis por los neutrófilos *in vivo* (Park *et al.* 1968).

Una vez en el sitio de la infección, los neutrófilos fagocitan y matan a los patógenos bacterianos. Durante la fagocitosis las bacterias también son expuestas a varios reactivos oxígeno independientes, tales como la peroxidasa, lisosima, varias enzimas hidrolíticas y lactoferrina (Sordillo *et al.* 1997).

La resistencia microbiana a la fagocitosis y al asesinato intracelular por los neutrófilos es dependiente de las diversas propiedades de la bacteria como son la cápsula, composición de la pared celular, toxinas y los inhibidores metabólicos. El grado de reducción de nitro azul de tetrazolium (NBT por sus siglas en ingles) depende primariamente de la generación de donadores de electrones como son los aniones superoxidos en los fagosomas. El fallo para reducir el NBT indican un bloqueo en el proceso metabólico oxidativo e inhabilita al fagocito para causar un daño oxidativo en la ingestión del

microorganismo. De aquí que, la reducción del NBT puede ser considerada una medida indirecta de la actividad microbicida oxígeno dependiente de los neutrófilos (Silva y Jain 1988).

La prueba para la reducción del NBT es una medida de la habilidad de los neutrófilos para producir el anion superóxido por la respiración, proporcionando información en ambos, actividad fagocítica y bactericida (Katamoto *et al.* 1998).

Las sales de tetrazolium pueden ser usadas ampliamente en estudios histoquímicos de varias enzimas. En el sitio de actividad enzimática la coloración de las sales de tetrazolium y la reducción del formazan insoluble en agua, puede fácilmente ser reconocido como un depósito de color azul profundo (Park *et al.* 1968).

Los reactivos de tinción de NBT son de uso diagnóstico *in vitro*." Para la demostración histoquímica de la reducción del NBT intracitoplasmático en neutrófilos, para identificar disfunciones de los neutrófilos y/o distinguir infecciones pirogénicas.

Se atribuye a Park y cols. La primicia en utilizar la prueba de reducción de nitroazul de tetrazolium NBT en neutrófilos, como ayuda de diagnóstico para diferenciar las condiciones febriles inducidas por bacterias, de aquellas de origen no bacteriano. La prueba consiste en la incubación de sangre con una solución tamponada de NBT. Las extensiones se preparan, se tiñen y se examinan en el microscopio para determinar el porcentaje de neutrófilos que presentan depósitos intracitoplasmáticos de formazán. Este porcentaje generalmente aumenta en infecciones bacterianas.

Algunos estados patológicos, especialmente aquellos que implican defectos metabólicos de la función neutrófila, muestran valores de la prueba de NBT bajos o normales, incluso cuando existe infección bacteriana activa. Estas condiciones pueden ser detectadas mediante la modificación de la prueba NBT para que incluya la estimulación *in vitro* del sistema fagocítico. Esta estimulación puede alcanzarse mediante la incorporación de filtrado de cultivo bacteriano, partículas de latex, cimosán, endotoxina, contacto con el vidrio, o

altas concentraciones de heparina, en la mezcla de incubación de sangre-NBT. La estimulación in vitro de la sangre de personas normales, sin defectos celulares o humorales y sin deterioro en el metabolismo granulocítico, mostrará un marcado aumento del porcentaje de formazán en los neutrófilos. Las células de pacientes con tales defectos (p.ej., granulomatosis crónica no muestran una respuesta positiva, ni siquiera con estimulación.

Se ha demostrado que los siguientes factores técnicos afectan a los resultados de la prueba NBT:

1. Duración y temperatura del almacenamiento de la sangre antes del ensayo.
2. Duración y temperatura de la incubación de la mezcla de sangre-NBT.
3. Concentración de la heparina o NBT.
4. Sangre capilar frente a sangre venosa.
5. Contacto con plástico frente al vidrio siliconizado durante la incubación.
6. Experiencia del observador.
7. Contacto con vidrio siliconizado frente a no siliconizado durante el almacenamiento o la incubación.
8. Recogida en tubos Vacutainer.
9. Criterios utilizados para identificar células positivas o negativas.
10. Uso de EDTA como anticoagulante, con resultado de inhibición de la respuesta de NBT.

Parece ser que el efecto inhibitor de EDTA se ha anulado si la prueba se lleva a cabo en capas leucocitarias preparadas con sangre total en presencia de Ficoll, un polímero de sucrosa. Se dice que el Ficoll ejerce un efecto protector sobre la membrana citoplasmática de los leucocitos durante la incubación de estos con NBT. El uso de capas leucocitarias para concentrar los neutrófilos, y por consiguiente acortar el tiempo de enumeración, también ha sido sugerido por Petterson y otros.

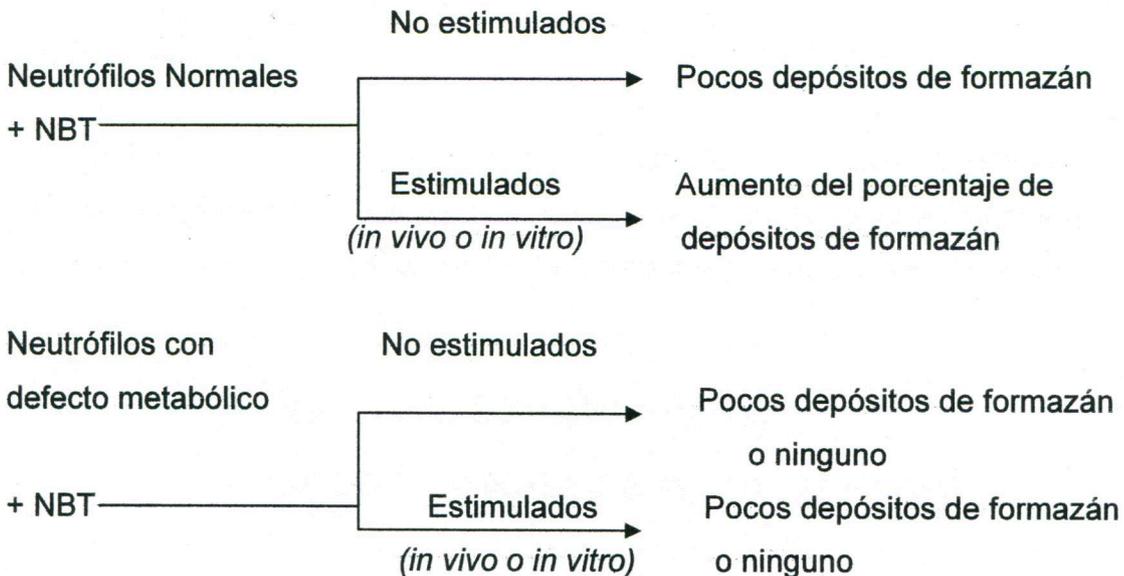
Como respuesta a la necesidad de normalización, Sigma-Aldrich® ofrece un procedimiento de NBT semicuantitativo, basado en una modificación del

método de Feigin y colaboradores, que proviene, a su vez, del método de referencia de Parks y colaboradores.

La prueba ha sido propuesta como ayuda para:

1. Identificar pacientes con granulomatosis crónica o condiciones similares debidas a defectos metabólicos de la función neutrófila.
2. Distinguir las condiciones febriles y/o las leucocitosis de infección bacteriana, de aquellas de origen no bacteriano.
3. Determinar la respuesta a la terapia antibiótica.
4. Monitorizar pacientes con alto grado de susceptibilidad a infecciones bacterianas.

Para realizar la prueba las muestras de sangre heparinizada se incuban con una solución tamponada de NBT en condiciones cuidadosamente controladas. Las extensiones se preparan, se tiñen y se examinan en el microscopio para determinar el porcentaje de neutrófilos que presentan depósitos intracitoplasmáticos de NBT reducido (formazán).



El rendimiento de un procedimiento "estimulado" puede resultar útil para revelar la presencia de un defecto neutrofílico intrínseco (Sigma).

Las deficiencias de se comprometen la función de los neutrófilos que son las células efectoras primarias en la eliminación inicial de infecciones (Sordillo *et al.* 1997).

Morgante *et al* (1999) suplementaron ovejas con vitamina E y selenio por vía parenteral durante el período seco, lo cual se asoció con una mejoría en la respuesta de los neutrófilos al NBT (Morgante *et al.* 1999). Mientras que Katamoto *et al* trabajaron con cabras sometidas a estrés calórico y no obtuvieron efecto del selenio y la vitamina E sobre la actividad de los neutrófilos (Katamoto *et al.* 1998).

A la fecha no se cuenta con estudios que determinen el efecto de la suplementación alimenticia con selenio orgánico en animales no sujetos a condiciones de estrés.

HIPÓTESIS

Nosotros esperamos que al suplementar ovejas jóvenes nulíparas en forma oral con selenio orgánico obtendremos una mejor respuesta de los neutrófilos en cuanto a su capacidad fagocítica.

OBJETIVO

El objetivo de esta tesis fue medir la función fagocítica de los neutrófilos mediante la prueba de reducción del NBT en sangre de ovejas jóvenes nulíparas, bajo condiciones no estresantes, suplementadas oralmente con selenio orgánico.

METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO

DEFINICIÓN DE LOS ANIMALES E INSTALACIONES

El experimento se realizó, durante los meses de mayo y junio de 2005, en el centro ovino del Dpto. de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-UL, ubicada al oriente de la ciudad de Torreón Coahuila, México (altitud 25°05' y 26°54' Norte, longitud 101°40' y 104°45' Oeste y

El selenio y la función de los neutrófilos

Las células inmunes como todos los otros tipos de células, requieren un adecuado abastecimiento de elementos traza para la estructura y función de las metaloproteínas que participan en mantener procesos tales como producción de energía y protección contra ROS (Failla 2003).

El selenio en si mismo no puede alterar la producción de ROS, pero el selenio disminuye los lipopolisacaridos que inducen la producción de ROS (Kim *et al.* 2004).

Los neutrófilos producen radicales derivados del superóxido para tomar parte en la matanza de los microbios. A pesar de que la deficiencia de selenio no afecta el número de neutrófilos en un rango de especies, hasta cierto punto algunos aspectos de dichas funciones se vuelven defectuosas. La habilidad para continuar produciendo radicales depende del decremento del estatus de selenio y la actividad de la glutatión peroxidasa en los neutrófilos. El selenio tiene un importante papel en la prevención del daño en la función de la respuesta inmune. Los neutrófilos de animales selenio-deficientes tienen menor capacidad de matar intracelularmente a los patógenos de la mastitis (Arthur *et al.* 2003).

El selenio es probablemente el micronutriente más caracterizado con respecto a efectos inmunorreguladores. El selenio es un componente vital de la enzima antioxidante glutatión-peroxidasa que es esencial para proteger células y los tejidos corporales del daño auto-oxidativo debido a la producción de radicales libres por ciertos leucocitos durante la fagocitosis (Sordillo *et al.* 1997).

El selenio dietético adecuado es esencial para la actividad virtual de todas las armas del sistema inmune, es particularmente significativo que la suplementación con selenio puede hacer mejoras en la función inmune en aquellos animales que consumen una dieta considerada adecuada según la OMS (Arthur *et al.* 2003).

1139 msnm) dentro de la Comarca Lagunera, con dirección Periférico y Carretera a Santa Fe.

Se llevó a cabo con 10 ovejas jóvenes seleccionadas al azar, todas hembras, de entre 10 y 11 meses, nulíparas (sin partos), obtenidas de la cruce de tres razas (Dorper, Tabasco y Black belly), con pesos de entre 20 y 40 kg. Todos estos datos fueron obtenidos antes de iniciar el experimento.

Las ovejas fueron repartidas al azar en dos grupos: testigo (n=5) y de prueba (n=5); no se uso ningún método de selección dado a que todos los animales tenían los mismos hábitos alimenticios, las mismas horas luz y demás factores externos y clínicamente sanas.

Las instalaciones destinadas para la realización fueron acondicionadas, de tal manera que, los animales en cuestión estuvieran lo más cómodos posibles, tanto para facilitar el manejo requerido para el experimento, como para evitar cualquier situación estresante para las borregas. Cada jaula tenía un bebedero, un recipiente para dar alimento y otro para proporcionar concentrado, y cada una de ellas contaba con una puerta para permitir la entrada al momento de proporcionar el alimento y demás componentes de la dieta de los animales. Se colocó una sombra en sobre las jaulas para evitar el posible estrés que el calor pudiera provocar en los animales. Se contaba con una manguera conectada a una fuente de agua, de tal suerte que siempre fuera posible proporcionar agua fresca a los animales.

El espacio destinado para la estancia de las borregas tenía un total de 90 m², y para cada una de las borregas se destinó un espacio de aproximadamente de 1.5 m x 1.5 m cercados. Durante la realización del experimento no se permitió el ingreso del semental a ninguna de las jaulas, pero, se mantuvo siempre a la vista de las borregas sin que este interfiriera con la alimentación y la suplementación de las mismas.

La dieta base para ambos grupos constó de 1 kg de heno de alfalfa (14.6% de P.C., 1.14 Mcal kg Enm) al día aproximadamente – dividido en dos tomas, una por la mañana (8:00 a 9:00 a.m.) y la otra por la tarde (6:00 a 7:00 p.m.) –, el concentrado que se les proporcionaba era un ensilaje de maíz (8.1% de P.C. y

1.62 Mca. Kg Enm), se acondicionaron los animales para el consumo del mismo iniciando con una cantidad de 50 g los primeros 2 días, los siguientes 2 días se elevó el nivel de concentrado de 50 g a 75 g/día, aumentando 25 g cada 2 días, hasta llegar a darles una cantidad de 250 g/día por animal (alrededor de 20 días para tal efecto), y el agua proporcionada a los animales era al libre acceso – con cambio regular de por lo menos 2 veces al día la cantidad de forraje ofrecido era la suficiente para cubrir el 100% de los requerimientos nutricionales (NRC, 1988) la dieta base fue mantenida a lo largo de todo el experimento, la cual fue complementada con una suplementación.

La suplementación se llevó a cabo con una solución preparada a base de glucosa al 45%, para el grupo de prueba la solución fue enriquecida con una cantidad de 2.0 mg del producto de “levadura de selenio” [Sel-Plex* de Lab. Altech de México] proporcionándoles una dosis de 20 ml diarios de esta solución a cada uno de los animales, y para el grupo control única y exclusivamente se le proporcionó una cantidad de 20 ml de solución de glucosa la 45% como suplementación. La suplementación se realizó al momento de proporcionarles el alimento que se les daba por la tarde, tanto para el grupo de prueba como para el testigo.

MUESTREO:

La sangre se obtuvo dentro de las 2 horas anteriores a la realización de la prueba, mediante una jeringa de plástico para venipunción. La aguja se retiraba de la jeringa antes de expulsar con cuidado exactamente 1 ml de sangre en un vial de recogida siliconizado que contenía 20 unidades de heparina (SIGMA 840-20). Se mezclaba bien, pero con cuidado, inclinando el vial ligeramente y haciéndolo rodar entre las manos durante aproximadamente 30 segundos, evitando el contacto de la sangre con el tapón.

REACTIVOS

VIAL DE NBT, SIGMA 840-10

Nitroazul de tetrazolium, 1 mg, liofilizado, con tampón fosfato y cloruro sódico.

HEPARINA, SAL SODICA, SIGMA 840-20

Viales de vidrio siliconizado con heparina (porcina), 20 unidades, para la recogida de 1 ml de sangre total.

VIALES DE VIDRIO CON TAPON, SIGMA 840-50

Viales siliconizados para la incubación de muestras.

TINCION DE WRIGHT ACCUSTAIN, SIGMA WS 10

Tinción de Wright, 0,3%, tamponada a pH 6,8, en metanol.

ESTIMULANTE, número de catalogo SIGMA 840-15

Extractos de bacterias (no viables), liofilizadas.

EQUIPO NECESARIO

Microscopio con objetivo de inmersión.

Micropipetas automáticas para el suministro exacto de los volúmenes requeridos para el ensayo.

Puntas de plástico para micropipetas.

Baño de agua a 37° C.

Portaobjetos para microscopio.

PROCEDIMIENTO:

La solución de NBT se prepara reconstituyendo un vial de NBT, con 1,0 ml de agua destilada. Dejar reposar durante unos minutos y mezclar vigorosamente. El vial reconstituido es estable durante 1 día si se guarda en el frigorífico (2-8° C).

La solución de estimulante se prepara reconstituyendo el estimulante, con 1,5 ml de agua destilada. Agitar hasta su disolución. Almacenar por debajo de 0° C. LA solución puede congelarse y descongelarse varias veces.

Prueba no estimulada:

Puede realizarse una prueba de NBT estimulada (tratamiento de la sangre con extracto bacteriano) como control positivo, al mismo tiempo que esta prueba de NBT no estimulado (o bien después de la misma), para detectar defectos metabólicos de la función neutrófila.

Incubación de la muestra y preparación de extensiones:

1. Con una pipeta de plástico, se transfiere la muestra a un vial 0,12 ml de solución NBT.
2. Se añaden 0,2 ml de sangre heparinizada bien mezclada. Mezclar bien, pero con cuidado, inclinándolo ligeramente el vial y haciéndolo rodar entre las dos manos. No invertir el vial. Cerrar bien.
3. Incubar durante 10 minutos a 37° C. Extraer el vial y dejarlo estabilizar a temperatura ambiente (18-26° C) durante 10 minutos más.
4. Mezclar de nuevo la mezcla de sangre heparinizada-NBT haciendo rodar el vial despacio entre las dos manos.
5. Con una pipeta de plástico, transferir 50-70 μ L de mezcla a un portaobjetos de vidrio limpio.

NOTA: Debe tenerse cuidado de minimizar el daño mecánico a los leucocitos durante la preparación de la extensión.

6. Preparar una extensión moderadamente gruesa para reducir el daño mecánico a las células con contenido de formazán, que se vuelven más frágiles. Dejar secar la extensión al aire.
7. Tratar la extensión con tinción de Wright ACCUSTAIN, WS 10 de la siguiente manera:
 - a. Cubrir la extensión seca con 1 ml de tinte durante 15 segundos.
 - b. Añadir 1 ml de agua destilada a la extensión cubierta de tinte, y dejarla reposar durante 30 segundos (un tiempo más prolongado aumentará la intensidad de la tinción).
 - c. Aclarar la extensión con agua, dejarla escurrir y secarla con papel secante o al aire.

Estimulación:

Este procedimiento puede realizarse simultáneamente con la prueba NBT no estimulada (o bien después de la misma), con una posible ayuda en la detección de defectos metabólicos de la función de los neutrofilos.

Incubación de la muestra y preparación de extensiones:

1. Transferir a un vial 0,1 ml de solución de NBT.

2. Con una pipeta de plástico, añadir 0,05 ml de sangre heparinizada y 5 μ l de solución de estimulante. Mezclar bien, pero con cuidado, inclinándolo ligeramente el vial y haciéndolo rodar entre las dos manos. No invertir el vial. Cerrar bien.
3. Seguir con los pasos 3 a 7, como en "Procedimiento no estimulado" y continuar con "Examen con el microscopio y recuento".

Los valores de la prueba se informan en términos de neutrófilos positivos (con formazán).

Examen con el microscopio y recuento:

Explorar la extensión teñida utilizando un objetivo de inmersión de aceite y contar un total de 100 neutrófilos o más. Registrar como positivos estos neutrófilos que contienen depósitos de formazán. Ocasionalmente, dichos neutrófilos pueden tener un aspecto difuso, pero habitualmente aparecerán inclusiones intracitoplasmáticas grandes, de forma irregular y de un color púrpura oscuro a negro. Al contar los neutrófilos como positivos, se recomienda seguir las estipulaciones siguientes:

1. Los neutrófilos deben estar enteros y la membrana celular debe estar intacta.
2. El neutrófilo debe estar solo, sin que ninguna otra célula ni material celular (excepto los hematíes) esté en contacto con él. Los neutrófilos que se encuentren en acumulaciones de leucocitos o plaquetas no deben contarse.
3. para que pueda considerarse positivo, el neutrófilo debe contener depósitos de formazán en forma de masas discretas, grandes y de forma irregular.
4. Seguidamente, se registra el porcentaje positivo de 100 o más neutrófilos contados.

NOTA: Sólo se cuentan los neutrófilos. Los depósitos de formazán también pueden aparecer en monocitos o en acumulación de plaquetas. Para afinar aún más, la determinación del porcentaje de neutrófilos NBT-positivos puede hacerse simultáneamente con un recuento total de leucocitos y el diferencial para permitir el cálculo del número absoluto de células positivas.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron analizados por el método estadístico de ANOVA, mediante el procedimiento GLM usando el programa estadístico SAS, con la finalidad de medir el efecto del tratamiento (selenio-testigo) sobre la respuesta de los neutrófilos estimulados o no, de acuerdo a la toma de muestras y se uso la prueba de diferencias mínimas significativas para ($<SD$) para evaluar la diferencia de medias entre los tratamientos.

RESULTADOS

Los resultados del experimento se ven expresados en los cuadros 1 y 2. En donde se observa que no existe diferencia significativa en la respuesta de los neutrófilos no estimulados al NBT ($P>0.05$) para los animales suplementados y los testigos, en las fechas 1 y 3, mientras que en las fechas 2 y 4 se presentó diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$).

En los resultados de la respuesta de neutrófilos estimulados al NBT encontramos que no se obtuvo diferencia significativa, en ninguno de los muestreos ($P>0.05$).

Cuadro 1: LSMEANS de porcentaje de neutrófilos no estimulados al NBT en ovejas con o sin suplemento oral de selenio

Variable	Selenio	Testigo	EE ¹	NSO ²
NBT1	1.83	3.96	0.07	0.70
NBT2	1.81	0.59	0.04	0.34
NBT3	0.53	1.27	0.35	0.52
NBT4	0.07	0.16	0.01	0.15

NOMENCLATURA

EE ¹= Error estadístico, NSO ²= Nivel de Significancia Observada

LT= Porcentaje de neutrófilos reductores

1,2,3,4= Número de muestras

Cuadro 2: LSMEANS de porcentaje de neutrófilos estimulados al NBT en ovejas con o sin suplemento oral de selenio

Variable	Selenio	Testigo	EE ¹	NSO ²
NBT1	2.76	5.63	0.15	1.23
NBT2	2.10	1.89	0.77	0.49
NBT3	2.78	1.62	0.13	0.47
NBT4	1.98	1.27	0.47	0.58

NOMENCLATURA

EE ¹= Error estadístico, NSO ²= Nivel de Significancia Observada

LT= Porcentaje de neutrófilos reductores

1,2,3,4= Número de muestras

En donde se observa que no existe diferencia significativa en la respuesta de los neutrófilos no estimulados al NBT ($P > 0.05$) para los animales suplementados y los testigos, en las fechas 1 y 3, mientras que en las fechas 2 y 4 se presentó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

En los resultados de la respuesta de neutrófilos estimulados al NBT encontramos que no se obtuvo diferencia significativa, en ninguno de los muestreos ($P > 0.05$).

DISCUSIÓN

Nosotros esperábamos que al suplementar ovejas jóvenes nulíparas en forma oral con selenio orgánico obtendríamos una mejor respuesta de los neutrófilos en cuanto a su capacidad fagocítica.

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio demuestran que las ovejas jóvenes nulíparas no sometidas a estrés no presentan aumento en la capacidad fagocítica de los neutrófilos sanguíneos cuando son suplementadas en forma oral con selenio orgánico (2ppm al día), ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo suplementado con selenio orgánico (Sel Plex®) durante un periodo de 2 meses.

A diferencia de los resultados obtenidos por Morgante et al (1999) que trabajaron con animales en período de parto, nuestros resultados no demuestran un efecto favorable del selenio al eliminar el factor estrés. Es probable que esto se deba a que nuestra población no presentaba inmunosupresión, debido a su edad, alimentación y cuidados óptimos.

Varios autores (Smith *et al.* 1997; Waller 2000; Monfardini *et al.* 2002) han observado que también la función de los leucocitos polimorfonucleares está alterada durante el periodo del parto, lo cual se puede deber a un desequilibrio entre la producción y los dispositivos de eliminación de los radicales libres oxígeno reactivos (Miller *et al.* 1993). Es por ello que el selenio al actuar como antioxidante da evidencia de mejorar la función de los neutrófilos en ese período. No obstante, Katamoto et al (1998), no encontraron diferencia significativa cuando probaron neutrófilos de cabras sometidas a estrés y suplementadas con selenio y vitamina E.

Meglia et al. (2001) encontraron cierta relación entre el estado de selenio, en animales alrededor del parto y la función del sistema inmune, concluyendo que el efecto benéfico ocurre solo en animales selenodeficientes, siendo esta una posible explicación de los resultados que obtuvimos al eliminar el factor estrés.

CONCLUSIONES

No existe una mejora significativa de la respuesta fagocítica de los neutrófilos en animales no sometidos a estrés cuando se les suplementa con selenio orgánico, por lo cual dicha suplementación se recomienda especialmente en animales que se someten a cualquier tipo de estrés, evitando así que se comprometa su respuesta inmunológica de tipo innato.

Es recomendable utilizar otra técnica de valoración de la capacidad fagocítica de los neutrófilos, que no implique la participación visual, ya que esto la hace ser dependiente de la experiencia del lector y del juicio individual.

LITERATURA CITADA

- Abbas, A. A., A. L. Lichtman, *et al.* (2002). Inmunología celular y molecular. México, McGraw-Hill-Interamericana.
- Arthur, J. R., R. C. McKenzie, *et al.* (2003). "Selenium in the immune system." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1457S-9S.
- Beckett, G. J. y J. R. Arthur (2005). "Selenium and endocrine systems." J Endocrinol **184**(3): 455-65.
- Bem, E. M. (1981). "Determination of selenium in the environment and in biological material." Environ Health Perspect **37**: 183-200.
- Burk, R. F., K. E. Hill, *et al.* (2003). "Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1517S-20S.
- Burton, J. L. y R. J. Erskine (2003). "Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease." Vet Clin North Am Food Anim Pract **19**(1): 1-45, v.
- Department of Bacteriology Innate immunity. (En línea) University of Wisconsin. <http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/>. (Consultado: 18/01/2006)
- Failla, M. L. (2003). "Trace elements and host defense: recent advances and continuing challenges." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1443S-7S.
- Georgieva, N. V. (2005). "Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review." Bulg J Vet Med **8**(1): 1-11.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, *et al.* (2004). "Inmunología." Editorial McGraw-Hill 5ta Edición: 1-20.
- Gunter, S. A., P. A. Beck, *et al.* (2003). "Effects of supplementary selenium source on performance, blood measurements, and immune function in beef cows and calves." J Anim Sci **81**(4): 856-64.
- Humphrey, B. D., E. A. Koutsos, *et al.* (2002). Requirements and priorities of the immune system for nutrients. In: Nutrition biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 18th annual symposium, Nottingham, UK., Nottingham University Press.
- Katamoto, H., H. Fukuda, *et al.* (1998). "Nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in heat stressed goats is not influenced by selenium and vitamin E injection." J Vet Med Sci **60**(11): 1243-9.
- Kim, S. H., V. J. Johnson, *et al.* (2004). "Selenium attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress responses through modulation of p38 MAPK and NF-kappaB signaling pathways." Exp Biol Med (Maywood) **229**(2): 203-13.
- Kim, Y. Y. y D. C. Mahan (2001). "Prolonged feeding of high dietary levels of organic and inorganic selenium to gilts from 25 kg body weight through one parity." J Anim Sci **79**(4): 956-66.
- Kleczkowski, M., W. Klucinski, *et al.* (2002). "Role of transition metals ion and reactive oxygen species in biological oxidation in cattle (part 1)." Pol J Vet Sci **5**(4): 263-8.
- Kleczkowski, M., W. Klucinski, *et al.* (2004). "Role of antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle--trace elements and enzymatic mechanisms (Part 3)." Pol J Vet Sci **7**(3): 233-40.
- Kleczkowski, M., W. Klucinski, *et al.* (2003). "Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle--nonenzymatic mechanisms (Part 2)." Pol J Vet Sci **6**(4): 301-8.

- Koenig, K. M., L. M. Rode, *et al.* (1997). "Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep." *J Anim Sci* **75**(3): 817-27.
- Martindale, J. L. y N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." *J Cell Physiol* **192**(1): 1-15.
- McIntosh, G. H. y P. J. Royle (2002). Supplementation of cows with organic selenium and the identification of selenium-rich protein fractions in milk. In CSIRO Health Science and Nutrition. 18th Annual Symposium. Australia.
- Meglia, G. E., A. Johannisson, *et al.* (2001). "Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows." *Acta Vet Scand* **42**(1): 139-50.
- Miller, J. K., E. Brzezinska-Slebodzinska, *et al.* (1993). "Oxidative stress, antioxidants, and animal function." *J Dairy Sci* **76**(9): 2812-23.
- Monfardini, E., M. Paape, *et al.* (2002). "Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition."
- Morgante, M., D. Beghelli, *et al.* (1999). "Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes." *J Dairy Sci* **82**(3): 623-31.
- Paape, M., J. Mehrzad, *et al.* (2002). "Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**(2): 109-21.
- Paape, M. J., D. D. Bannerman, *et al.* (2003). "The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk." *Vet Res* **34**(5): 597-627.
- Paape, M. J. y A. V. Capuco (1997). "Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats." *J Anim Sci* **75**(2): 556-65.
- Paape, M. J., K. Shafer-Weaver, *et al.* (2000). "Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells." *Adv Exp Med Biol* **480**: 259-77.
- Park, B. H., S. M. Fikrig, *et al.* (1968). "Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic acid." *Lancet* **2**(7567): 532-4.
- Segal, A. W. (2005). "How neutrophils kill microbes." *Annu Rev Immunol* **23**: 197-223.
- Serdaru, M., L. Vladescu, *et al.* (2004). "Fluorimetric study of the selenium course in the dam-calf relationship." *Small Rum Res* **99**(1-3): 133-22.
- Sigma, A. Manual de Procedimientos. Procedimiento número 840.
- Silva, I. D. y N. C. Jain (1988). "Phagocytic and nitroblue tetrazolium reductive properties of bovine neutrophils for mammary pathogens." *J Dairy Sci* **71**(6): 1625-31.
- Smith, K. L., J. S. Hogan, *et al.* (1997). "Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality." *J Anim Sci* **75**(6): 1659-65.
- Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver, *et al.* (1997). "Immunobiology of the mammary gland." *J Dairy Sci* **80**(8): 1851-65.
- Thurnham, D. I. (1997). "Micronutrients and immune function: some recent developments." *J Clin Pathol* **50**(11): 887-91.
- Waller, K. P. (2000). "Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics." *Adv Exp Med Biol* **480**: 231-45.