

INTRODUCCION

Es reconocido que los elementos traza son requeridos para desempeñar diferentes actividades y numerosas funciones de las células inmunes, pero el papel específico de estos micronutrientes inorgánicos no está definido .

El selenio fue descubierto por Berzelius y Gahn en 1817 mientras examinaban el sedimento de una planta de ácido sulfúrico en Gripsholm, Suecia. Se entiende fácilmente que había muchos escépticos cuando la primera evidencia fue presentada en 1957 de que el selenio podía ser un elemento esencial, hasta 1997 se reconocían por lo menos 15 diferentes selenoproteínas mamíferas o selenoenzimas y arriba de 7 selenoenzimas microbianas (Swecker, 1997).

El selenio es un elemento traza que se incorpora en forma de selenocisteína (Jeong *et al.*, 2002). Regula las funciones de muchas proteínas reguladoras involucradas en señales de transducción y afecta una variedad de actividades celulares, incluyendo crecimiento celular y supervivencia (Kim *et al.*, 2004a), debido a los roles vitales que juegan las selenoproteínas (Gromer *et al.*, 2003). Induce la detención del ciclo celular en diferentes fases dependiendo de la forma de Se y el tipo de célula, modula la actividad celular presumible por actuar sobre la función de muchas proteínas intracelulares importantes para las señales de transducción. Sin embargo, las funciones moduladoras del selenio y otros selenocompuestos sobre el señalamiento intracelular no están completamente caracterizadas (Gopee *et al.*, 2004).

Se ha recibido mayor atención en investigaciones hechas en el último cuarto del s XX, ya que es esencial para una eficiente y efectiva operación de muchos aspectos del sistema inmune (en selección, maduración y activación de algunos eventos de las células inmunes) tanto en animales como en disponibilidad de herramientas tales como biología celular analítica, la genética molecular y otras tecnologías.

SELENIO FUNCIONES BIOLÓGICAS

El selenio está ampliamente distribuido en el ambiente (agua, sólidos, aire) aunque en bajas concentraciones (<1ug/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, .

El selenio es un elemento traza que se incorpora en forma de selenocisteína (Jeong *et al.*, 2002). Regula las funciones de muchas proteínas reguladoras involucradas en señales de transducción y afecta una variedad de actividades celulares, incluyendo crecimiento celular y supervivencia (Kim *et al.*, 2004a), debido a los roles vitales que juegan para una o varias selenoproteínas (Gromer *et al.*, 2003), induce la detención del ciclo celular en diferentes fases dependiendo de la forma del Se y el tipo de célula modula la actividad celular presumiblemente por actuar sobre la función de muchas proteínas intracelulares importantes para las señales de transducción. Sin embargo, las funciones moduladoras del selenio y otros selenocompuestos sobre el señalamiento intracelular no están completamente caracterizadas (Gopee *et al.*, 2004).

La enzima glutatión-peroxidasa contiene como componente esencial al selenio y es esencial para proteger a las células y tejidos del daño auto-oxidativo debido a la producción de radicales libres. El selenio es necesario para el funcionamiento apropiado de neutrófilos, macrófagos, células NK, linfocitos T y algunos otros mecanismos inmunes. Una deficiencia en selenio da como resultado una migración reducida de neutrófilos hacia el sitio de

infección, deficiencias en el procesamiento por muerte intracelular en los neutrófilos y baja producción de peróxido de hidrógeno extracelular.

Cuando se evalúa la función de los neutrofilos en animales selenodeficientes, se revela un posible incremento en enfermedades infecciosas, aumenta la acumulación de H_2O_2 y disminuye la concentración de enzimas; lo último se ha ligado a la producción de radicales oxigenotóxicos, que disminuyen la viabilidad y reducen la capacidad de destrucción intracelular de los patógenos.

El selenio modula la función inmune y una variedad de respuestas celulares como son proliferación, sobrevivencia y muerte; este elemento influye tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa en el sistema inmune (Arthur *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004)

El Se puede influir en tres grandes áreas por lo menos de la bioquímica celular: la función antioxidante, el estado redox y el metabolismo de la hormona tiroidea (Beckett y Arthur, 2005).

Además de la eliminación de bacterias invasoras patógenas y hongos, el selenio también es esencial para otros aspectos de la inmunidad mediada por células. Esto incluye la remoción de virus y la destrucción de células neoplásicas. La importancia del Se en reproducción en hembras no es clara; sin embargo, experimentos en roedores sugieren que la deficiencia de Se no tiene efecto significativo, incluso en la sexta generación de animales. No obstante, estudios "in Vitro" usando células de la granulosa de bovinos obtenidas de folículos de diferente tamaño encontraron que el Se estimula significativamente la proliferación de pequeños folículos y aumenta los efectos estimulantes de las gonadotropinas en las mismas células. El Se también refuerza la producción de estradiol (Beckett y Arthur, 2005)

En rumiantes, los niveles debajo de $50\mu\text{g/L}$ en sangre total indican un estado de deficiencia; concentraciones de $50\text{-}75\ \mu\text{g/L}$ en sangre se consideran marginales, pero otros autores consideran que por lo menos $100\ \mu\text{g/L}$ en sangre total son requeridas para la fertilidad y para tener una capacidad inmune óptima, incluso recomiendan $200\ \mu\text{g/L}$ para resistir a infecciones

tales como mastitis, siendo el equivalente inferior de 0.5 µg/ml y superior de 0.7 µg/ml en el plasma (Pherson *et al.*, 1999)

SELENOPROTEINAS

Las selenoproteínas están involucradas en muchos aspectos del metabolismo celular, lo cual incrementa el potencial para reconocer los aspectos adversos causados por la deficiencia de selenio y aquellos causados por la falla de los sistemas antioxidantes. Mas de 20 selenoproteínas han sido caracterizadas por purificación, clonación, expresión recombinante y predicción de función utilizando técnicas bioinformáticas (Arthur *et al.*, 2003).

La mayoría de las selenoproteínas que han sido caracterizadas tienen alguna función antioxidante. La selenoproteína P ha sido implicada como un antioxidante por la aparente correlación de esta con la protección contra la necrosis inducida de hígado en ratas con deficiencia de selenio (Burk *et al.*, 2003).

La selenoproteína P y la glutathion peroxidasa extracelular (GPx-3) son las únicas selenoproteínas conocidas del plasma. La selenoproteína P es un buen marcador del estado nutricional de selenio. La selenoproteína P es la única selenoproteína caracterizada hasta ahora que contiene más de un átomo de selenio por cadena polipeptídica. Esta es sintetizada en hígado y secretada dentro del plasma (Burk *et al.*, 2003).

La selenoproteína P es una de las 2 más conocidas selenoproteínas extracelulares. Su concentración en plasma es sensible al estado nutricional de selenio del individuo, haciendo a esta un útil biomarcador del estado del selenio. Esta funciona en la distribución de selenio del hígado a tejidos periféricos tal como el cerebro. Hay evidencia que esta funciona como un antioxidante, protegiendo las células endoteliales de las moléculas oxidantes. Debido a su ubicación en el plasma y a su origen predominante en el hígado, la selenoproteína P ha sido postulada como una proteína de

transporte de selenio del hígado a otros tejidos, además de la afinidad de la proteína por la membrana celular (Buró *et al.*, 2003).

Las selenoproteínas incorporan Se traduciéndolo como una selenocisteína residual que es completamente ionizada por el pH fisiológico y actúa como un muy eficiente catalizador redox (Beckett y Arthur, 2005).

Así como las GPx, las selenoenzimas forman familias de 3 tioredoxin reductasa y 3 iodotironina deiodinasas, siendo 3, de las cuales 2 (tipo I Y II) activan la hormona tiroidea para convertir T4 a T3 y el tipo III inactiva T3. Estas dan funciones esenciales al selenio en el control redox de muchas funciones metabólicas en células así como en el metabolismo de la hormona tiroidea (Arthur *et al.*, 2003).

Otras selenoproteínas que pueden tener funciones antioxidantes son las selenoproteínas P y W. Otra proteína que contiene selenio es la selenofosfato sintetasa, la cual cataliza la producción de selenofosfato. Este selenofosfato es un precursor inorgánico esencial para la síntesis de selenocisteína de serina durante la síntesis de selenoproteínas (Arthur *et al.*, 2003).

TIPOS DE SELENIO

Existen fuentes orgánicas e inorgánicas de este elemento, investigaciones recientes con selenio orgánico (selenolevadura), han demostrado que las vacas suplementadas con esta fuente de selenio son más efectivas al transferir el selenio a becerros por vía de transferencia placentaria y leche que las vacas suplementadas con selenito de sodio. Se ha demostrado que el Se de selenito de sodio es pobremente transferido a la leche y que es incapaz de mantener el estado de selenio en terneros lactantes (Gunter *et al.*, 2003).

Varias investigaciones han demostrado que el selenito y selenato son igualmente aprovechados por las vacas, de tal forma que las características pro-oxidativas del selenito carecen de efectos negativos en animales, porque las dos sustancias siguen un camino metabólico y similar después de ser

absorbidas por el tracto digestivo, esperando que el selenato se reduzca a selenito por microorganismos ruminales y el Se inorgánico puede ser parte de la reducción a elementos inobtenibles en el rumen. Se ha señalado que los antioxidantes en el alimento son parcialmente destruidos durante el almacenamiento por la presencia de sustancias oxidativas. Es posible que la presencia del selenito en el alimento comercial pueda tener un efecto deteriorante preferible como suplemento alimenticio (Pehrson *et al.*, 1999).

SUPLEMENTACION DIETETICA

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).

La evaluación del estado nutricional de un animal depende de marcadores bioquímicos tales como concentraciones de ascorbato en leucocitos y plasma, el retinol plasmático y niveles de Fe y Zn. 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).

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 han demostrado que varias de estas sustancias y sus deficiencias tienen profundos efectos en el sistema inmune de varios animales (Sordillo *et al.*, 1997).

En la respuesta inmune se han usado modelos in Vitro involucrando diferentes tipos de células inmunes de animales que consumen dietas con diferentes concentraciones de nutrientes en una respuesta medida y los efectos nutricionales en vivo comprende diferentes dietas combinadas experimentalmente o inyectadas para medir dicha respuesta, resultado de apoyo útil el ganado lechero y de engorda (Weber, 1995).

Cuando el suplemento de micronutrientes suministrado es limitado, la resistencia a enfermedades puede tener prioridad por algunos nutrientes, que son mas criticos para la supervivencia, pero algunos de estos efectos son contradictorios por el hecho de que las enfermedades pueden disminuir las concentraciones de micronutrientes en el plasma y esto se pueden malinterpretar como una deficiencia. Las deficiencias de micronutrientes no siempre aumentan la susceptibilidad de los animales hacia las enfermedades inducidas experimentalmente o en forma natural, pero si difieren de los estudios hechos en animales sanos (Thurnham, 1997).

La eficiencia de absorción de muchos minerales traza y factores dieteticos que afectan la biodisponibilidad de los minerales difiere grandemente entre rumiantes y no rumiantes. En rumiantes, la digestión microbiana en el rumen y el retículo preceden la digestión mamífera en el abomaso e intestino delgado. Las dietas de los rumiantes son usualmente altas en fibra, y la digestión considerable de fibra ocurre vía a la fermentación microbiana en el rumen. La biodisponibilidad del selenio es reducida por el alto azufre dietetico y la presencia de glicósidos carcinogénicos en ciertas legumbres (Spears, 2003).

Investigaciones limitadas sugieren que el alto o bajo calcio dietetico pueden reducir la absorción de selenio. En vacas lecheras no lactantes, la absorción de selenio fue maximizada con 8.0 g de calcio/kg de dieta. Las vacas jóvenes simentadas con calcio dietetico extremadamente bajo (1.7 g de calcio/kg de dieta) o alto (23.5 g de calcio/kg de dieta) no se afecto significativamente la absorción de selenio (Spears, 2003).

Un nivel dietetico alto de selenio en combinación con una gran reserva tisular puede contribuir a la concentración de selenio en el cuerpo y podría exacerbar la condición selenotica. Sin embargo, seria anticipado que una

vez que el crecimiento del tejido se retarde y se produzca los aumentos del catabolismo o del volumen del tejido, un nivel dietético más alto de selenio conjuntamente con mayores depósitos de selenio en el tejido pueda contribuir a la concentración del selenio en el cuerpo y podría exacerbarse la condición selenotica (Kim *et al.*, 2004a).

Las deficiencias dietéticas que llevan al estrés oxidativo en el hospedero pueden alterar el genoma viral, de tal modo que un virus normalmente benigno o ligeramente patógeno se vuelve altamente virulento en la deficiencia del hospedero oxidativamente estresado. Una vez que la mutación viral ocurre, incluso el hospedero con nutrición normal puede ser afectado por la cepa nuevamente patógena (Beck *et al.*, 2003).

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).

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

Las células contienen una cierta defensa antioxidante para minimizar las fluctuaciones en especies oxígeno reactivas (ROS por sus siglas en inglés), pero la generación de ROS con frecuencia excede la capacidad antioxidante de las células dando como resultado una condición de estrés oxidativo terminal. Numerosos mecanismos de respuesta al estrés tienen como objeto evolucionar, y son rápidamente activados en respuesta del ataque oxidativo. Algunos de los mecanismos son preferentemente un vínculo para realzar la

supervivencia, mientras otros son más frecuentemente asociados con muerte celular. (Kleczkowski *et al.*, 2003).

CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes previene el efecto de los radicales libres de oxígeno y la producción de peróxido lipídicos, clasificándose en primarios, secundarios y terciarios, dependiendo de su función (Cespedes *et al.*, 2000)

En el primer grupo, los Primarios Enzimáticos, se encuentran fermentos que protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres, entre los que se encuentran.

- 1) Superóxido dismutasa (SOD) que transforma el oxígeno en H_2O_2 .
- 2) Glutatió Peroxidasa (GSH-Px) que convierte H_2O_2 y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres.
- 3) Proteínas de unión a metales (GP) que frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical OH.

El segundo grupo de antioxidantes, los Secundarios No Enzimáticos se dividen en 2 Subgrupo.

- A) Antioxidantes hidrofílicos: donde se localiza la vitamina C, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina.
- B) Antioxidantes lipofílicos: entre los que se encuentran la vitamina E, los carotenoides y las ubiquinonas.

Dentro de los antioxidantes terciarios, encargados de reparar biomoléculas dañadas por los radicales libres, se incluyen las proteasas reparadoras de ADN y la Metionina sulfóxido reductasa (Cespedes *et al.*, 2000)

La defensa antioxidante, enzimática y no enzimática protege al organismo contra el daño oxidativo, pero no con el 100% de deficiencia, los antioxidantes no enzimáticos son frecuentemente añadidos a los alimentos para prevenir la peroxidación lipídica que se asocia a numerosas patologías y a estados de estrés oxidativo (Cespedes *et al.*, 2000).

SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está compuesto por una variedad de células y órganos que interactúan para defender al cuerpo en contra de patógenos, y tiene dos inmunidades: una innata y otra adaptativa (Abbats *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. El otro es el componente específico o inmunidad adaptativa, que no actúa hasta que existe un reto antigénico para el organismo, respondiendo al desafío con un grado elevado de especificidad y con la propiedad de “memoria”, observándose una reacción inmunitaria adaptativa contra un antígeno en el transcurso de 5-6 días después de exposición inicial a ese antígeno (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).

LEUCOCITOS PMN.

Los neutrófilos producen radicales derivados del superóxido para llevar a cabo 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 status 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 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).

ESTRUCTURA DEL NEUTROFILO

La estructura de los neutrófilos ha sido cuidadosamente definida. El citoplasma de los PMN es peculiar por contener gránulos citoplasmáticos que proporcionan constituyentes para eliminar a las bacterias, además contienen grandes reservas de glucógeno para proporcionar energía y tienen una superficie en espiral que se usa favorablemente para la fagocitosis de bacterias y para la formación de vacuolas intracelulares fagocíticas (Paape *et al.*, 2003).

La célula está delineada por una membrana plasmática que tienen un número 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 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., 2003).

La característica mas 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 glucógeno 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)

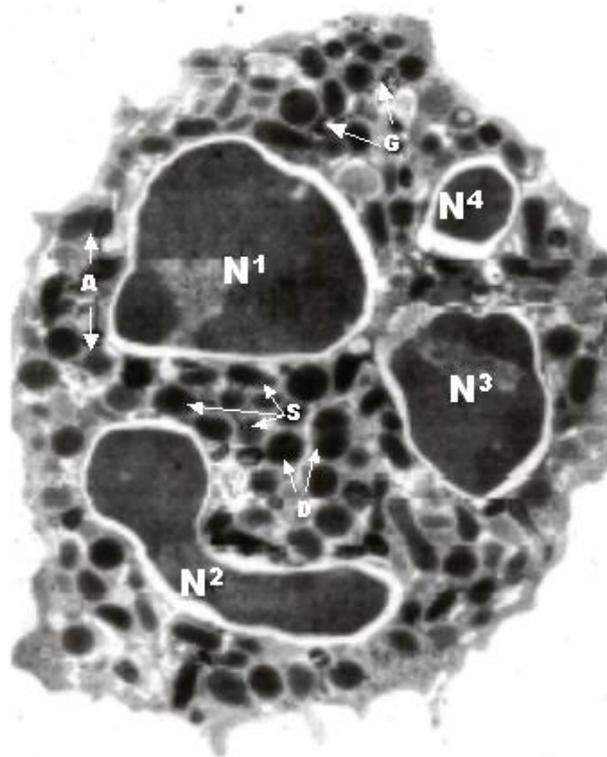


FIGURA. 1. Micrografía de microscopio electrónico de transmisión de un leucocito polimorfonuclear neutrófilo bovino (PMN) aislado de sangre. El leucocito está limitado por la membrana plasmática y contiene porciones de un núcleo multilobulado (N1-N4), gránulos de glucógeno (G), gránulos específicos (S), gránulos azurofílicos (A) y grandes gránulos densos (D). Los gránulos azurofílicos están teñidos más intensamente que los gránulos específicos y que los gránulos grandes electrodensos, debido a que el leucocito fue incubado con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno. Como resultado, se forma en los gránulos azurofílicos un producto electro-denso indicativo de la actividad peroxidativa (x22 000)

CINETICA DE LOS NEUTROFILOS O LEUCOCITOS PMN

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 pasan a 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 número constante en sangre, leche y tejidos (Paape *et al.*, 2002)

Cuadro 2. Leucocitos totales por μ l de sangre y porcentaje de cada leucocito

	C.	T.				
	Leucocitos	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
Especie		%	%	%	%	%
Cabra	8000-12000	35-40	50-55	5	2-5	<1
Ovejas	7000-10000	25-30	60-65	5	2-5	<1
Vacas	7000-10000	25-30	60-65	5	2-5	<1

Tomado de: Swenson, M. J., and W. O. Reece (1999). Características funcionales y componentes celulares y químicos de la sangre. México, Editorial Noriega.

Los neutrófilos proveen la primera línea de defensa del sistema inmune innata ya sea fagocitosis, destruyendo y digiriendo a las bacterias y los hongos. Previamente se creía que la destrucción se lograba por los radicales libres del oxígeno y otras especies de oxígeno reactivas generadas por la oxidación del NADPH, y por los haluros oxidados producidos por el mieloperoxido. Ahora sabemos que eso es incorrecto. La oxidasa bombea electrones dentro de la vacuola fagocítica, con esto induce una carga a través de la membrana que debe ser compensada. El movimiento de iones produce condiciones en la vacuola que conducen a la matanza microbiana y a la digestión por las enzimas liberadas dentro de la vacuola desde los gránulos citoplasmáticos (Segal, 2005).

La ingestión de patógenos por neutrófilos es mediada por anticuerpos (inmunoglobulinas) y complementos que se unen a la bacteria en un proceso llamado opsonización. Los neutrófilos receptores de inmunoglobulinas y complementos actúan como puentes entre los neutrófilos y los patógenos.

Los 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 secreción de citoquinas 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).

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

PERIPARTO

La susceptibilidad de las vacas lecheras a las enfermedades infecciosas como la mastitis, es más alta durante la etapa de periparto 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 en importantes funciones como la fagocitosis y la migración (Meglia *et al.*, 2001).

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 éstas. (Thurnham, 1997; Meglia *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que hay una depresión en los niveles sanguíneos de calcio, zinc, magnesio, fósforo, potasio, selenio, y de vitaminas A y E durante el periodo de parto. Varios de estos nutrientes son importantes para el sistema inmune. (Thurnham, 1997).

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.*, 2003).

FUNCION ANTIOXIDANTE DEL SELENIO

Un daño oxidativo demuestra un amplio espectro de rango de respuestas que pueden ir desde proliferación y detención del crecimiento, envejecimiento, hasta muerte celular.(Georgieva, 2005).

El Se es un micronutriente esencial presente en tejidos corporales. Es importante fisiológicamente porque es un componente integral de la enzima celular peroxidasa glutatiónica (GSH-Px) que ayuda a destruir ciertos peróxidos tóxicos dentro de las células corporales. Aparentemente la Actividad de la GSH-Px es la función mas importante del Se en los animales, pues las concentraciones tanto tisulares como sanguíneas del Se están altamente relacionadas con la actividad de la GSH-Px y relacionadas directamente la entrada de Se. Durante el metabolismo del oxígeno dentro de las células, se producen grandes cantidades de O_2 y H_2O_2 que pueden dañar severamente la membrana lipídica, el ADN, las proteínas celulares y las enzimas. La función específica de la GSH-Px es la conversión de H_2O_2 a agua y los hidroperóxidos lipídicos al alcohol correspondiente. Cuando la concentración del H_2O_2 es baja, hay menos cambio en los radicales OH^\cdot que se formarán. El radical OH es una ROS extremadamente dañino para las células (Swecker, 1997; Bull, 2000).

Sholz y Hutchinson determinaron que la actividad de la GSH-Px difiere entre el plasma, los eritrocitos y los neutrofilos, siendo cuatro veces mayor en los

leucocitos que en los eritrocitos. En los eritrocitos y en los neutrofilos aumenta relativamente al reemplazo celular en la circulación, sin embargo, se ha observado que la suplementación “*in Vitro*” de Se en cabras selenodeficientes, aumenta los niveles de Se en la sangre, en el suero, en los neutrófilos y la actividad de GSH-Px pero en el ganado se requiere de días a semanas de suplementación para obtener resultados en la función de los neutrófilos (Swecker, 1997).

OBJETIVO:

En el presente trabajo, se suplementó a cabras gestantes desde el día 30 antes de la supuesta fecha de parto, hasta 30 días después, con la finalidad de observar si existe una elevación en alguno de los tipos de leucocitos sanguíneos.

MATERIALES Y METODOS

Animales

El experimento se realizó de diciembre del 2005 a enero del 2006, en el Centro Caprino del Dpto., de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna, en Torreón, Coahuila, México (25°33' 26.18" Norte, y 103°22' 22.81" Oeste y 1139 msnm), utilizando 10 cabras multíparas gestantes, con aproximadamente 120 días de gestación, comprobada por ultrasonido y sin signos clínicos de mastitis. Las cabras fueron estabuladas en corraletas individuales y recibieron una alimentación consistente en 1.4 kg de alfalfa y 0.550 kg de concentrado al día y libre acceso al agua.

Las cabras se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos, el primero (GS, n=5), recibió suplementación diaria de selenio orgánico [3.0 mg de Sel Plex® en 10 ml de solución glucosada al 25%, según lo sugerido por Ortman y Pehrson] y el grupo control (GC, n=5) el cual sólo recibió 10 ml de solución glucosada al 25%

INSTALACIONES

Las instalaciones destinadas para la realización fueron acondicionadas, de tal manera que, los animales en cuestión estuvieran lo mas cómodos posibles, tanto para facilitar el manejo y el parto de estas, y no provocar ninguna situación estresante para las cabras. Cada jaula tenia el espacio correcto y contaba con un bebedero, y la comida se servia en el comedero por divisiones para que cada una comiera su ración del día, también contaba cada una de las jaulas con una puerta para permitir la entrada y salida al hacer el muestreo.

El espacio destinado para la estancia de las cabras fue de aproximadamente 1.5m x 1.5 m cercados. Durante la realización del experimento se estuvo pendiente del parto para poder proporcionar el calostro a las crías y de ahí seguir alimentándolas hasta terminar con el proyecto.

Muestras

Se tomaron muestras de sangre por punción yugular al inicio de la suplementación (muestra basal), 15 días antes de la fecha calculada para el parto, en las 24 horas posteriores al parto, y a los 15 y 30 días después del mismo. Las muestras fueron colectadas en tubos Vacutainer® con EDTA. A la par, se almacenaron a -20°C , alícuotas de las muestras en tubos eppendorf para posteriormente llevar a cabo la determinación de los niveles de selenio por fluorimetría.

Cuentas diferenciales de leucocitos en sangre

Las cuentas diferenciales de leucocitos se determinaron sobre laminillas de sangre teñidas con hemocolorante Rápido (Hycel, Cat. 548), contando 100 leucocitos, para conocer el porcentaje de neutrófilos y de linfocitos.

Determinación de selenio en sangre

Los niveles de selenio se midieron en sangre total, ya que se ha señalado que la hemólisis de los eritrocitos puede causar falsas elevaciones en los valores séricos de selenio. Se utilizó la técnica de fluorimetría, previa digestión ácida de las muestras, según lo sugerido por (Sheehan y Gao 1990)

La fluorescencia fue medida con un fluorómetro (Modelo LS-20; Perkin-Elmer) equipado con un filtro de excitación a 366 nm y un filtro de emisión a 520 nm.

Todos los reactivos empleados tenían un grado analítico de pureza, el agua pura se obtuvo por doble destilación y doblemente desionizada. Se preparó una solución stock ácida de Se (IV) de 1000 mg/L. La solución de tetrahidrocloreto de 3,3'-diamino bencidina se preparó inmediatamente antes de usarla al 0.5% en agua pura, protegiéndola de la luz fluorescente del laboratorio.

Las muestras se digirieron previamente con una mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico (1/1 en vol). El ácido reductor fue el ácido clorhídrico (50%).

Para la curva de calibración se prepararon soluciones acuosas de la solución stock ácida de selenio de 0 a 200 µg/L que se almacenaron a temperatura ambiente.

Análisis estadístico de los resultados

Los datos fueron analizados por medio del SAS usando el PROC GLM para medidas repetidas, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + TRT_i + TIEMPO_j + TIEMPO \times TRT_{ij} + e_{ijk}$$

donde: Y_{ij} = variable dependiente, μ = media, TRT_i = efecto de la suplementación, $TIEMPO_j$ = efecto de la fecha de muestreo, $TIEMPO \times TRT_{ij}$ = interacción entre la suplementación y la fecha en que se muestreó y e_{ijk} = término del error. Cuando el modelo fue significativo, se utilizó la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (DMS) para determinar las diferencias entre días de muestreo.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se reflejan los resultados de los porcentajes de los distintos tipos celulares y los niveles de selenio sanguíneo que se registraron en las cabras suplementadas con levadura de selenio vía oral y en las del grupo control. El porcentaje de linfocitos fue mayor ($P < 0.01$) en el grupo suplementado que en el control (GC 59.9 vs GS 64.3). Ni los porcentajes de PMNs ni los niveles de selenio sanguíneo mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre ambos grupos

CUADRO 1: Medias de mínimos cuadrados y desviación estándar del error (DEe) de parámetros hematológicos, porcentaje de neutrófilos sanguíneos con capacidad reductora del Nitroazul de Tetrazolio (NBTR) y niveles sanguíneos de selenio para cabras con suplemento oral (GS) de Se orgánico (3 mg^{-d}) y cabras sin suplemento (GC).

Parámetro	GC (n=5)	GS (n=5)	DEe	NS ¹
PMNs (%)	31.8	29.5	1.03	0.13
Linfocitos (%)	59.9	64.3	1.13	0.01
Selenio (ppm)	0.69	0.71	0.10	0.85

¹Nivel de significancia

El porcentaje de neutrófilos en sangre (Fig. 1) no arrojó diferencia entre los grupos en ninguna de las fechas de muestreo sin embargo, se observa una elevación ($P < 0.01$) en la fecha d 15 con respecto a la d 30 en el grupo control, aunque no se registró diferencia del d 15 respecto a las otras fechas de muestreo. Esta elevación (d 15) no se observó en el grupo suplementado

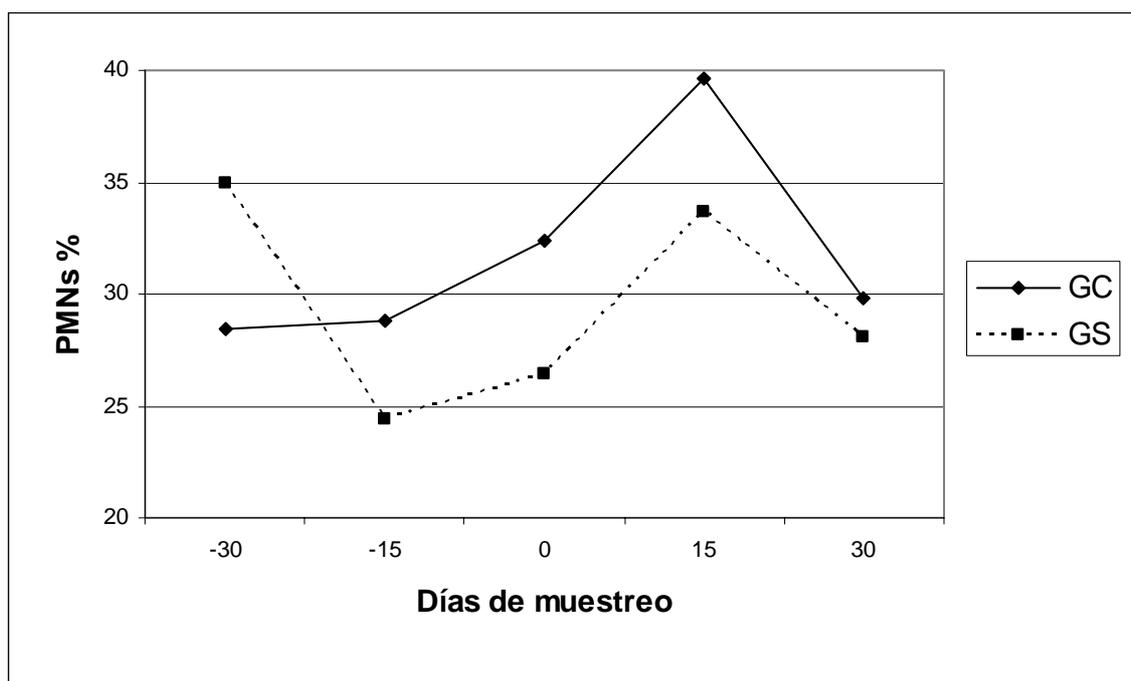


FIGURA 1. Efecto de la suplementación oral con levadura de selenio (3 mg-d) sobre el porcentaje de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en cabras en periparto (GC = Grupo Control; GS = Grupo Suplementado; † = $P < 0.05$ entre días de muestreo, †† = $P < 0.01$ entre días de muestreo).

Los linfocitos (Fig. 2) mostraron el d 0 un mayor porcentaje ($P < 0.01$) en el grupo suplementado con respecto al grupo control (70.4 vs. 56.4) y en relación al tiempo de muestreo, se registró un elevación en GS con respecto al día -30, mientras que en el grupo control el porcentaje de linfocitos sanguíneos no varió ($P > 0.05$) a través del tiempo. Finalmente, los niveles sanguíneos de selenio no mostraron cambios significativos ($P > 0.05$) ni entre grupos experimentales, ni entre tiempos de muestreo (Fig. 3).

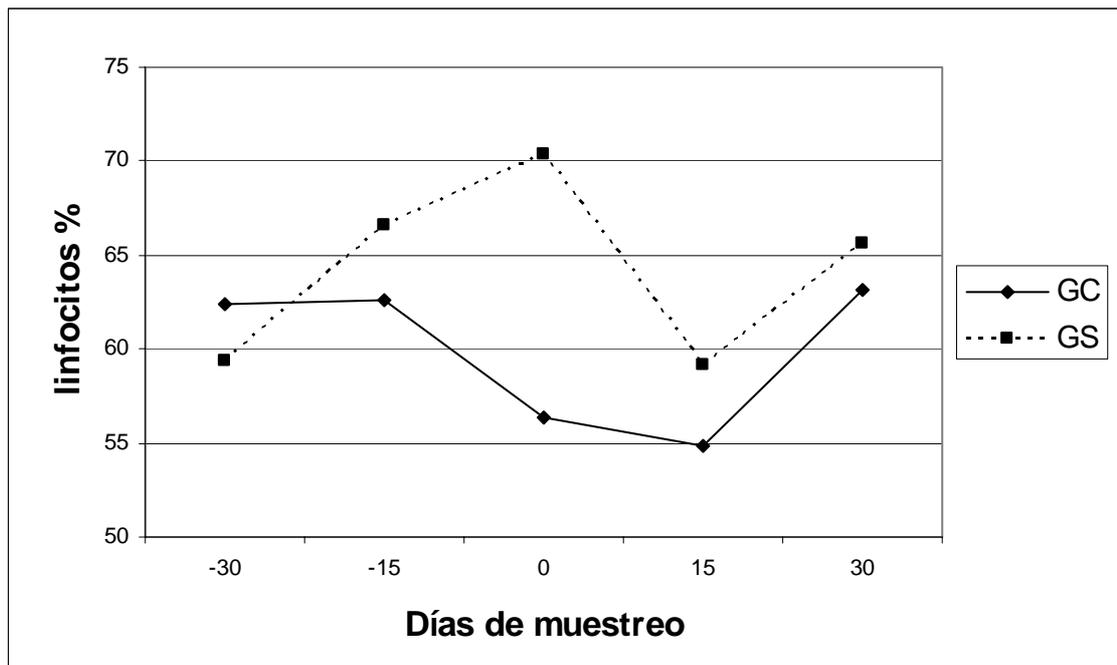


FIGURA 2. Efecto de la suplementación oral con levadura de selenio ($3 \text{ mg}^{-\text{d}}$) sobre el porcentaje de linfocitos sanguíneos en cabras en periparto (GC = Grupo Control; GS = Grupo Suplementado; ** = $P < 0.01$ entre tratamientos, †† = $P < 0.01$ entre días de muestreo).

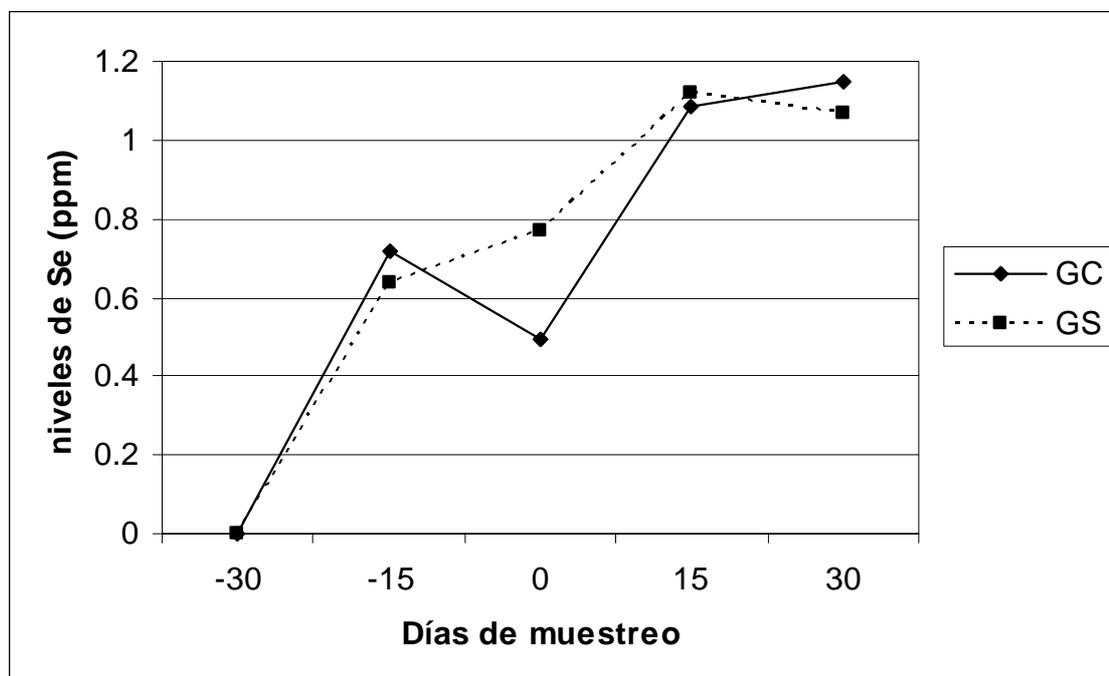


FIGURA 3. Efecto de la suplementación oral con levadura de selenio ($3 \text{ mg}^{-\text{d}}$) sobre los niveles sanguíneos de selenio en cabras en periparto (GC = Grupo Control; GS = Grupo Suplementado).

DISCUSIÓN

El selenio, forma parte de la enzima GSH-Px que es un antioxidante intracelular que protege contra las actividades citotóxicas de los metabolitos de oxígeno, lo cual ayuda a que los neutrófilos mejoren su función. La participación del selenio en la mejora de la función de los neutrófilos ha sido demostrada en vacas y en ovejas

Es importante mencionar que el mayor grado de actividad de los PMNs se encontró en la fecha 15d, lo cual indica que es en ese momento cuando los animales están más protegidos contra las infecciones, siendo esto favorable, pues es en esta etapa de la lactación cuando puede haber una mayor susceptibilidad a las infecciones por patógenos intramamarios.

Morgante et al (1999)., en su experimento con ovejas tampoco señalan un aumento del número de neutrófilos, pero si una mejor función de los mismos. Los autores que han estudiado efectos de la suplementación oral con selenio orgánico en vacas, han reportado elevaciones en las concentraciones de selenio en sangre y plasma, por lo cual era de esperar que en cabras se presentara un comportamiento similar, sin embargo, los resultados reflejan que los niveles de suplementación empleados en el experimento no fueron suficientes para que en el tiempo que duró el experimento se lograra una elevación de las concentraciones de selenio en sangre. En un experimento realizado por Knowles et al, (1999) se manejaron dos distintos niveles de suplementación (2 y 4 mg de selenio), comprobando que en el menor nivel se tuvo una mayor respuesta del selenio en sangre, mostrando marcada elevación en el d 21 de la suplementación. Esto se explica por una saturación de los mecanismos de absorción y distribución del selenio dietético hacia la sangre. Es probable que algo semejante suceda en cabras y que a la concentración de selenio que se utilizó para suplementar ($3\text{mg}^{-\text{d}}$) se haya dado una saturación que no permitió apreciar una elevación de selenio en sangre. Una recomendación pudiera ser estudiar si a concentraciones de suplementación menores se observa el mismo efecto en la función de los PMNs y alguna elevación en los niveles sanguíneos de selenio.

Los PMNs en la sangre de las cabras del grupo control aumentaron en el día 15 después del parto con respecto al porcentaje inicial ($P < 0.01$) y volvieron a su nivel original a los 30 días, lo cual concuerda con lo establecido por Waller y Kulberg para el comportamiento de estas células en el periparto, mientras que los PMNs del grupo suplementado no manifestaron ninguna elevación.

El hallazgo observado con respecto a los linfocitos fue una marcada elevación de éstos en el GS en comparación con el GC (64.3 vs 59.9), lo cual no ha sido reportado anteriormente por otros autores que han experimentado con bovinos y ovinos. No obstante Saito et al. (2003) mencionan que la suplementación con selenio favorece la proliferación de linfocitos T. Resulta interesante que el pico de este aumento se encontró al momento del parto (Fig. 2) pues podría estar relacionado con un efecto inmunoestimulante sobre la respuesta inmune de tipo celular, por lo cual se recomienda realizar estudios más profundos a este respecto, para aclarar si el comportamiento de los linfocitos observado en este experimento es el común cuando se suplementa levadura de selenio a cabras durante el periparto.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos hacen pensar que la suplementación con selenio orgánico vía oral a cabras en periparto, pudiera estar asociada a un aumento en el número de linfocitos sanguíneos.

El pico de aumento de linfocitos se encontró al momento del parto podría estar relacionada a un efecto inmunoestimulante sobre la respuesta inmune de tipo celular por lo cual se recomienda realizar estudios más profundos a este respecto para aclarar el comportamiento de los linfocitos observado en este experimento.

Una recomendación pudiera ser si a concentraciones de suplementación menores se observa alguna elevación en los niveles sanguíneos de selenio

LITERATURA CITADA

- Abbats, A. y A. L. Lichman (2002). "Inmunologia celular y molecular." McGraw-Hill - interamericana.
- Arthur, J. R., R. C. Mckenzie y G. J. Beckett (2003). "Selenium in the immune system." J Nutr **133**: 1457S-1459S.
- Bull, R. C. (2000). "Trace Minerals and immunology." BCH: 5454.
- Burk, R. F. y K. E. Hill (2003). "Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P." J Nutr **133**: 1517S-1520S.
- 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.
- Cespedes, C. T. y S. D. Sanchez (2000). "Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementacion." Rev Cubana Cardiol **14(1)**: 55-60.
- 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. y T. L. Kindt (2004). "Inmunologia." Ed McGraw - Hill **5**: 1-20.
- Gopee, V. Neera, J. Victor, Johnson, P. Raghbir y Sharma. (2004). "Sodium Selenite-Induced Apoptosis in Murine B-Lymphoma Cells Is Associated with Inhibition of Protein Kinase C-Delta, Nuclear Factor kappa β , and Inhibitor of Apoptosis Protein." Tox Sci **78**: 204-214.
- Gromer, L. Johansson, H. Bauer, L. D. Atscott, S. Rauch, D. P. Ballou, C. H. Williams, R. H. y S. J. Arnér (2003). "Active sites of thioredoxin reductases: Why selenoproteins?" NAS of the USA **100**: 12618-12623.
- Gunter, S. A. y P.A. Beck (2003). "Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves." J. Anim. Sci. **81**: 856-864.
- Jeong, D. W., S. Yoo, J. H. Kim y I. Y. Kim (2002). "Protection of mice from allergen-induced asthma by selenite: prevention of eosinophil infiltration by inhibition of NF-kappa B activation." J Biol Med **277**: 17871-6.
- Kim, S. H. y V. T. Johnson (2004a). "Selenium attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress responses through modulation of p38 MAPK and NF-Kappa B signaling pathways." Exp Biol Med **229**: 203-213.
- Kim, Y. M., H. J. Kim, E. J. Song y K. J. Lee (2004b). "Glucuronic acid is a novel inducer of heat shock response." Mol Cell Biochem **259(1-2)**: 23-33.
- Kleczkowski, M. y W. Klucinski (2003). "Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle-nonenzymatic mechanisms." Pol J Vet Sci **6(4)**: 301-308.
- Meglia, G. E., A. Johannisson, L. Petersson y K. Persson Waller (2001). "Changes in some Blood Micronutrients, Leukocytes and Neutrophil Expression of Adhesion Molecules in Periparturient Dairy Cows." Acta vet, scand **42**: 139-150.
- Miller, J. K., B. Slobodzinska. y F. C. Madsen (1993). "Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function." J Dairy Sci **76**: 2812-2823.
- Paape, M. y J. Mehrzad (2002). "Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes". " J Mammary Gland Biol Neoplasia **7(2)**(109-21).
- Paape, M. J., D. Douglas, Bannerman, X. Zhao y J.-W. LEE. (2003). "The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk." Vet. Res. **34**: 597-627.

- Pehrson, K. a. O., N. Madjid y U. Trafikowska (1999). "The influence of Dietary Selenium as Selenium Yeast or Sodium Selenite on the Concentration of Selenium in the Milk of Suckler Cows and on the Selenium Status of Their Calves." J. Anim. Sci. **77**: 3371-3376.
- Pherson, B., K. Ortman, y T. U. (1999). "The influence of Dietary Selenium as Selenium Yeast or Sodium Selenite on the Concentration of Selenium in the Milk of Suckler Cows and on the Selenium Status of Their Calves." J Dairy Sci. **77**: 3371-3376.
- Segal, A. W. (2005). "How neutrophils kill microbes." Annual Review of Immunology **23**: 197-223.
- Sordillo, L. M., K. S. Weaver y D. DeRosa (1997). "Immunol of the Mammary Gland." J Dairy Sci **80**: 1851-1865.
- Spears, J. W. (2003). "Trace Mineral Bioavailability in Ruminants." J. Nutr. **133**: 1506S-1509S.
- Swecker, W. S. (1997). "Selenium and immune Function in Cattle." Compend Contin Educ Pract Vet- Food Anim: S248-S285.
- Thurnham, D. I. (1997). "Micronutrient and immune functions: some recent developments." J Clin Pathol **50**: 887-891.
- Weber, G. G. (1995). "Micronutrientes e inmunidad. II. Vitaminas." XI FEDNA.