

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL
CON SELENIO ORGÁNICO SOBRE LOS
NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS DE CABRAS
EN PERIPARTO**

MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el
grado de

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

Subdirección de Posgrado

Torreón, Coahuila, México.

Octubre de 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON
SELENIO ORGÁNICO SOBRE LOS NEUTRÓFILOS
SANGUÍNEOS DE CABRAS EN PERIPARTO**

POR

MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor principal:

Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Asesor Interno:

Dr. Pedro A. Robles Trillo

Asesor Externo:

MC. Estela Alejandra Garabito García

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirector de Posgrado

M. C. Gerardo Arellano Rodríguez
Jefe del Departamento de Posgrado

Torreón, Coah. México

Octubre de 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON
SELENIO ORGÁNICO SOBRE LOS
NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS DE CABRAS
EN PERIPARTO**

POR

MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

Elaborado bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor

Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Torreón, Coah. México

Octubre de 2006

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis no hubiera sido posible sin la contribución muy especial del Doctor Miguel Arenas Vargas quien es el iniciador del sistema de enseñanza por autogestión del CIDE. Gracias a su apoyo y dirección y a la confianza que tuvo en que sin dejar de atender mis demás tareas yo podría alcanzar el grado de maestría, es que ahora estoy por obtenerlo.

Gracias también al cuerpo de asesores del Programa de Posgrado en Ciencias Agropecuarias, pues el apoyo de todos, tanto externos como internos debo el haber logrado este trabajo. Mi agradecimiento muy especial al Doctor Rafael Rodríguez Martínez quien es el Coordinador General del Programa y quien fue el asesor principal de este trabajo.

Gracias a las autoridades de la UAAAN, de manera especial al Jefe del Departamento de Postgrado en la Unidad Laguna MC Gerardo Arellano Rodríguez por haber conseguido la autorización al Programa como Programa Piloto de Posgrado

Mi agradecimiento muy particular al MC. José Luis Corona Medina por su apoyo incondicional y todas sus asesorías y por compartir conmigo sus conocimientos.

Y gracias a todos mis compañeros del posgrado por sus revisiones a mis trabajos, por sus críticas constructivas y por su amistad.

Gracias también a mis sinodales MC. Alejandra Garabito García y Dr. Pedro Antonio Robles Trillo por sus comentarios y apoyo para la publicación de este trabajo

A Laboratorios Altech de México por la donación de la levadura de selenio que se utilizó en el experimento.

DEDICATORIA

A mis padres

Que son mi enlace con el pasado

A mis hijos

Que son mi enlace con el futuro

Cada investigador latinoamericano es esencialmente un lobo solitario: el trabajo grupal interdisciplinario es casi desconocido entre nosotros y, cuando se practica, no es raro que resulte penalizado.

Marcelino Cerejido

PREFACIO

Según la SAGARPA, México ocupa el primer lugar en América Latina en caprinocultura, con nueve millones 500 mil cabezas. La producción de carne en 2004 se estima fue de casi 47 mil toneladas, y la producción de leche de 155 millones de litros. Esta actividad productiva ha venido tomando auge en nuestro país, y muestra de ello es que el pronóstico de producción de leche de esta especie fue superior en el 2004 en un tres por ciento, siendo los principales estados productores Coahuila, Durango, Guanajuato, Chihuahua y Jalisco. La caprinocultura, va dejando de ser actividad de pastores, para pasar a ser actividad de grandes explotaciones. Esto trae como consecuencia un desequilibrio en el estado general de los animales, ya que el hecho de vivir estabulados les implica cambios en su rutina de vida, lo cual se refleja en su estado de salud. Los animales que viven estabulados tienen menor acceso a fuentes naturales de minerales, además, el hacinamiento y las exigencias de producción, así como la presencia constante del hombre y el uso de máquinas de ordeño les provocan un estrés adicional. Todo esto puede ocasionar una depresión del sistema inmunológico, que tiende a reflejarse en una mayor susceptibilidad a las infecciones, principalmente en tiempos en los que ya de por sí por condiciones naturales el sistema inmunológico se deprime, como es el período del periparto, etapa en la que se aumenta el estrés, debido al

proceso del parto y a la instalación de la lactancia entre otras cosas. De allí la gran importancia de buscar las condiciones necesarias para que los animales de las explotaciones puedan mantener las condiciones que les permitan tener un estado inmunológico apropiado para poder enfrentar el ataque de microorganismos patógenos con éxito. Uno de los mecanismos que se ha utilizado más es a través de la alimentación, pues no cabe duda que un balance energético positivo y una buena dosis de nutrientes y micronutrientes permitirá al organismo mantener en buen estado el funcionamiento del sistema inmune.

La intención de esta investigación fue en primera instancia, cumplir con el requisito para la obtención de un grado de maestría, pero también hacer un aporte al conocimiento en un área que hasta la fecha sigue estando dentro de los temas de investigación del nuevo siglo, ya que el mejor desarrollo del sistema inmunológico puede ayudar a enfrentar con éxito no sólo procesos infecciosos, sino problemas mayores como el cáncer o el SIDA.

Este trabajo se desarrolló dentro de un sistema innovador de educación de postgrado en la cual el alumno a la par de ir desarrollando habilidades de investigación llega por si solo a la elección de su objeto de estudio. Fue así como al iniciar la recopilación de información sobre el tema "Mastitis", encontré dos caminos para abordar el problema, uno era el aspecto de la infección y los agentes que la producían y otro era el de la resistencia que presentaban algunos animales que se encontraban "al parecer" en iguales condiciones que los que se infectaban. Fue así como empecé a investigar las funciones de defensa que impiden a ciertos animales sucumbir a la infección y al continuar

en el análisis de los documentos, me percaté de que una de las fronteras de la ciencia se hallaba en esos momentos en el estudio de la suplementación con minerales que refuerzan los sistemas de defensa, considerándose uno de los mas importantes el selenio y su actividad antioxidante. Además, siendo los neutrófilos una de las principales células de defensa del organismo, e importante productor de radicales libres, resulta interesante comprobar si el selenio favorece la función de los neutrófilos eliminando el excedente de radicales libres y evitando un estado de oxidación.

Obviamente, los temas en los que necesitaba recopilar información se habían multiplicado, pues entre ellos tenía: Estrés oxidativo, Polimorfonucleares, Sistema Inmune y Nutrición, Suplementación con Selenio, etc. La búsqueda de la información se hizo por medio de Current Contents y utilizando como sistema de alerta el programa EndNote del ISI Thompson, conectando a la Base de Datos de la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) de Estados Unidos de Norteamérica (Medline). Se elaboraron bases de datos con ayuda del EndNote y se fueron adquiriendo los documentos, ya en papel, ya en formato electrónico, por medio de búsquedas de los mismos en las páginas de Internet de las revistas o por solicitud directa a los autores vía e-mail, hasta que finalmente se logró integrar un acervo de 389 documentos, mismos que se leyeron y analizaron para lograr la elaboración de un protocolo de investigación que se registró en el Departamento de Investigación de la Universidad con la clave 2776 del año 2005. Luego vino la parte experimental, que se llevó a cabo en las instalaciones y laboratorios de la misma Universidad, para lograr la

recuperación de datos, los cuales se analizaron estadísticamente para poder dar una interpretación a los resultados.

No me cabe la menor duda de que mi formación como investigador ha tenido buen inicio, y gran parte de ello es debido a las reuniones de socialización en las que he ido compartiendo mis avances con todos los compañeros y asesores tanto internos como externos de este programa de formación de investigadores dirigido por el CIDE (Centro de Innovación y Desarrollo Educativo) en las cuales han surgido dudas, ideas, sugerencias, etc. que me han permitido ir creciendo como investigadora y como profesionalista, ya que todo ello me ha sido de gran utilidad y lo he aprovechado también con mis alumnos. Espero sinceramente que el programa sea aceptado como definitivo en la UAAAN, pues le permite a gente como yo, que no podemos solicitar permisos laborales ni dejar de atender nuestras obligaciones personales, continuar con nuestra formación académica.

El presente trabajo se presenta a manera de tesis, pero cabe mencionar que también se envió como artículo para su publicación en la Revista Veterinaria México de la UNAM y la carta de aceptación se anexa como apéndice.

COMPENDIO

Efecto de la suplementación oral con selenio orgánico sobre los neutrófilos sanguíneos de cabras en periparto

POR

MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Maestría en Ciencias Agropecuarias

Torreón, Coah. 2006

El efecto de la suplementación oral con selenio orgánico sobre la respuesta inmune de cabras periparturientas se evaluó en diez hembras gestantes, cinco suplementadas con levadura de selenio vía oral (grupo control, GS), desde los 30 d antes de la fecha calculada para el parto y hasta 30 d después del mismo y, cinco cabras sin suplementación de selenio (grupo control, GC). Se tomaron muestras de sangre al iniciar la suplementación (d -30), y posteriormente los días -15, 0, 15 y 30 con respecto al parto. Se midieron la cantidad de leucocitos totales ($\times 10^3/\mu\text{L}$), el porcentaje de neutrófilos y linfocitos, y los niveles sanguíneos de Se (ppm), así como la capacidad microbicida de los neutrófilos (% de NBTR). Los datos se analizaron mediante ANOVA. Los resultados mostraron diferencia ($P < 0.01$) en el número de leucocitos (GS 8.2 vs GC 9.5), mientras que ni en el porcentaje de neutrófilos ni en los niveles de selenio se registraron diferencias ($P < 0.05$) entre ambos grupos. Por otra parte, la

capacidad microbicida de los neutrófilos, fue mayor ($P < 0.01$) en el GS que en el GC (9.3 vs 6.8). También se observó en la cuenta diferencial, un porcentaje mayor ($P < 0.01$) de linfocitos en las cabras del grupo GS (64.3) que en el del grupo GC (59.9). Los resultados confirman que la suplementación con selenio orgánico a cabras en periparto tiene un efecto favorable sobre la respuesta inmune.

PALABRAS CLAVE: leucocitos, mastitis, PMN, sangre, antioxidantes

ABSTRACT

**Effect of organic selenium oral supplementation on blood
neutrophils of goats in peripartum**

BY

MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

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

Torreón, Coah. 2006

The effect of oral supplementation with organic selenium on immune response of periparturient goats, was studied in ten pregnant females, five orally supplemented with selenium yeast (control group, GS), at 30 d before anticipated kidding until 30 d postpartum, and five without selenized supplementation (control group, GC). Starting supplementation (d -30) blood samples were collected and again on d -15, 0, 15 and 30. Total leukocytes number ($\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrophile and lymphocyte percents, Se serum levels (ppm), and killing microorganisms' capacity (% NBTR) were measured. Data were analyzed by ANOVA. Results showed difference ($P < 0.01$) in leukocytes number (GS 8.2 vs GC 9.5), but neither neutrophile percent nor selenium levels

registered difference ($P < 0.05$). On the other hand, neutrophile killing capacity was higher ($P < 0.01$) in GS goats than in GC ones (9.3 vs 6.8). Differential count with a greater leukocyte percent ($P < 0.01$) was also observed in GS goats (64.3) than in the GC group (59.9). Our results confirm that organic selenium supplementation to goats at peripartum improve the immune response.

Key words: leukocyte, mastitis, PMN, blood, antioxidants

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA.....	vi
PREFACIO	vii
COMPENDIO	xi
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE DE CONTENIDO	xv
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	xvii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Factores de susceptibilidad a la mastitis	10
Inmunidad de la glándula mamaria.	12
Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos	14
Estructura fina de los PMNs.	18
Migración de PMNs desde la sangre hacia la glándula mamaria.....	20
Células somáticas	24
El estrés oxidativo	30
Papel de la nutrición en la respuesta inmune.	36
Papel de los elementos traza en la función inmune.....	37
Generalidades del selenio.	40
Papel Biológico del selenio.....	43
Biodisponibilidad del Selenio	46
Selenio orgánico contra Selenio inorgánico	49
Determinación del estado de la función de los neutrófilos.....	51
Métodos para la determinación de selenio.....	53
Neutrófilos y Selenio	55
MATERIALES Y METODOS	59
Animales.....	59
Muestras.....	59
Cuentas totales y diferenciales de leucocitos en sangre	60
Prueba de Reducción del NBT	60
Determinación de Selenio en sangre	61
Análisis estadístico de los resultados.....	62
RESULTADOS	63

DISCUSIÓN	68
LITERATURA CITADA	72

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Inicio y propagación de metabolitos oxígeno reactivos.....	33
Cuadro 2. Resumen de los efectos de los oligonutrientes sobre la inmunidad de la glándula mamaria.	36
Cuadro 3: Respuesta de algunas funciones inmunes a las deficiencias experimentales de vitaminas.....	37
Cuadro 4: Selenoproteínas de mamífero y sus funciones.....	44
Cuadro 5: Medias de mínimos cuadrados y desviación estándar del error (DE) 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).	63
Figura 1. Micrografía de microscopio electrónico de transmisión de un leucocito polimorfonuclear neutrófilo bovino (PMN) aislado de sangre.....	20
Figura 2: Pasos que siguen los neutrófilos para llevar a cabo las funciones de vigilancia inmunológica y destrucción de agentes patógenos.....	24
Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión tomada de una sección de una biopsia de glándula mamaria.	26
Figura 4: Número y tipo de células somáticas en leche durante las distintas etapas del ciclo de lactación.	28
Figura 5. Sistemas de protección contra los metabolitos oxígeno reactivos.	32
Figura 6. Incorporación del selenio en las selenoproteínas.....	45
Figura 7. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio (3 mg ^d) sobre el porcentaje de neutrófilos sanguíneos reductores de NBT en cabras en periparto.....	64
Figura 8. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio (3 mg ^d) sobre el porcentaje de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en cabras en periparto.....	65
Figura 9. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio (3 mg ^d) sobre el porcentaje de linfocitos sanguíneos en cabras en periparto.....	66
Figura 10. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio (3 mg ^d) sobre el número total de leucocitos sanguíneos en cabras en periparto.....	66
Figura 11. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio (3 mg ^d) sobre los niveles sanguíneos de Selenio en cabras en periparto.....	67

INTRODUCCIÓN

Es bien sabido, que a pesar de las numerosas prácticas de higiene ambiental, de nutrición y vacunación, la mastitis sigue siendo un problema en la producción lechera, principalmente en vacas que se encuentran en el período cercano al parto (Aarestrup y Jensen, 1997; Kaneene et al., 1997; Smith et al., 1997; Mallard et al., 1998; Drackley y K., 1999; Wagter et al., 2000; Burton et al., 2001). Esta susceptibilidad a la mastitis en el período cercano al parto sin duda se debe a la supresión generalizada del sistema inmune, reportándose que la alteración de los mecanismos de resistencia de la vaca lechera empieza normalmente tres semanas antes del parto, alcanzando su máximo durante el mismo y continúa hasta tres semanas después (Mallard et al., 1998). También se ha reportado (Mallard et al., 1998; Waller, 2000; Monfardini et al., 2002) que la función de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) se altera durante el periodo del parto, especulándose que la función atenuada de los neutrófilos PMNs contribuye al aumento en la incidencia de la mastitis post-parto.

La fagocitosis por PMNs es la defensa más efectiva contra infecciones bacterianas. Para que la fagocitosis ocurra, el reconocimiento entre bacterias y PMNs es dirigido por componentes del complemento e inmunoglobulinas. Una vez que éstos se unen a los receptores sobre la superficie de los PMNs, las células se vuelven activas y se inicia la explosión oxidativa. Esta respuesta va seguida de un incremento en el consumo de oxígeno por la vía metabólica de la hexosa monofosfato y es comúnmente conocida como "estallido respiratorio", proceso en el cual se liberan grandes cantidades de ión superóxido (O_2^-) y

peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El O_2^- y el H_2O_2 formados sobre la superficie celular y la membrana fagosómica interactúan para formar el radical hidroxilo (OH^-) y el oxígeno singular (O), componentes claves de los mecanismos destructores oxígeno-dependientes de los PMNs (Paape et al., 2003). Sin embargo, un desequilibrio entre la producción de los radicales libres oxígeno-reactivos y sus dispositivos de eliminación, puede contribuir a los desórdenes del parto en las vacas lecheras (Miller et al., 1993). Este desequilibrio puede evitarse con el uso de ciertos nutrientes y antioxidantes, cuyo papel en relación con la respuesta inmune y la mastitis ha sido ampliamente discutido (Hogan et al., 1993; Miller et al., 1993; Smith et al., 1997; Burton et al., 2001; Chaiyotwittayakun et al., 2002; Esfandiari et al., 2003; Failla, 2003), reconociéndose que las células inmunes, al igual que otros tipos celulares, requieren un suplemento adecuado de elementos traza para su estructura y función.

Smith *et al* (1997), señalan que la función de los neutrófilos se altera en el ganado con deficiencias de selenio, sugiriendo que esto es causa de un aumento de la susceptibilidad a enfermedades infecciosas tales como la mastitis y la metritis y que en vacas deficientes en selenio, pero con niveles adecuados de vitamina E, los neutrófilos tienen una elevada acumulación de peróxido de hidrógeno, viabilidad disminuida y capacidad reducida para matar intracelularmente a los patógenos de la mastitis, sin que el nivel del selenio influya sobre su capacidad para fagocitar bacterias. Ortman y Pehrson (1999), reportan que a niveles semejantes de suplementación, el Se orgánico es más

efectivo que el selenito de sodio para aumentar la concentración de Se en sangre total, en plasma y, posiblemente para aumentar la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) en los eritrocitos.

A la fecha no se cuenta con estudios que determinen el efecto de la suplementación oral con selenio orgánico (Se-levadura) sobre las funciones de defensa en cabras, motivo por el cual, se evaluó el papel que el selenio orgánico tiene sobre el número de leucocitos y el porcentaje de polimorfonucleares sanguíneos, los niveles de selenio en sangre y la capacidad microbicida de los polimorfonucleares en cabras durante el periparto.

REVISIÓN DE LITERATURA

Existe un gran número de reportes que describen que en las vacas lecheras hay cambios en el tránsito de leucocitos y una disminución en la función de algunos aspectos inmunológicos durante el período cercano al parto (Mallard et al., 1998; Waller, 2000; Meglia et al., 2001; Kulberg et al., 2002; Monfardini et al., 2002).

El período de transición comprendido entre la preñez tardía y la lactación temprana (llamado también período de periparto) es en verdad la etapa mas interesante del ciclo de lactación del ganado lechero. No obstante que la longitud del tiempo clasificado como período de transición es definida de diferente manera por distintos autores, para los fines del presente trabajo se describirá de acuerdo con Drackley (1999), como el período comprendido entre la tercera semana antes del parto y la tercera semana después del mismo. Además es importante mencionar que la mayoría de las enfermedades infecciosas y los desórdenes metabólicos suceden durante este tiempo.

Es bien sabido que a pesar de las numerosas prácticas de higiene ambiental, de nutrición y vacunación, la mastitis sigue siendo un problema en la producción lechera, principalmente en vacas que se encuentran en el período cercano al parto (Aarestrup y Jensen, 1997; Kaneene et al., 1997; Smith et al., 1997; Mallard et al., 1998; Drackley y K., 1999; Wagter et al., 2000; Burton et al., 2001). Esta susceptibilidad a la mastitis en el período cercano al parto se debe sin duda a la supresión generalizada del sistema inmune, reportándose que la alteración de los mecanismos de resistencia de la vaca lechera empieza

normalmente tres semanas antes del parto, alcanzando su máximo durante el mismo y continúa hasta tres semanas después (Mallard et al., 1998).

Mallard (1998), menciona que numerosos estudios confirman que hay aspectos tanto de la inmunidad innata como de la adquirida que están en condiciones subóptimas en el período cercano al parto en las vacas. Debido a que la función primaria del sistema inmune es proporcionar defensas contra los organismos patógenos invasores del hospedero, es lógico que se tengan hipótesis que hablen de que la deficiencia de esta función puede ser al menos en parte responsable de la alta prevalencia de enfermedades durante este período.

A pesar de la inmunosupresión que se presenta durante el periparto, en sangre periférica se encuentra un incremento del número de leucocitos totales, debido principalmente a una elevación en el número de neutrófilos (Waller, 2000; Meglia et al., 2001; Kulberg et al., 2002). Según Waller (2000), estudios al respecto, han reportado durante el parto números significativamente altos de leucocitos totales, de polimorfonucleares y de monocitos en sangre, comparados con aquellos que se presentan un mes antes y un mes después del mismo, mientras que el número de linfocitos y eosinófilos no cambió.

Los valores pico de las cuentas de leucocitos se encuentran en el momento del parto, declinando poco a poco hasta alcanzar las condiciones basales a las dos semanas después del mismo. Las altas concentraciones de glucocorticoides que ocurren fisiológicamente durante el parto, se han sugerido como explicación del incremento de neutrófilos que se observa alrededor del mismo (Kulberg et al., 2002).

Es bien sabido que los glucocorticoides inducen inmunosupresión y, aunque el mecanismo exacto se desconoce, se cree que se puede deber a que los glucocorticoides incrementan la salida de neutrófilos de la médula ósea induciendo una separación enzimática de la L-selectina que se encuentra sobre la superficie de los mismos. La expresión reducida de la L-selectina dispara la población de neutrófilos que se encuentra en la zona marginal hacia la circulación periférica, dando como resultado un gran número de neutrófilos circulantes con menor capacidad para migrar hacia los sitios de inflamación. En consecuencia, los animales se vuelven más susceptibles a las infecciones (Kulberg et al., 2002).

Varios autores (Mallard et al., 1998; Waller, 2000; Monfardini et al., 2002) han observado también que la función de los leucocitos polimorfonucleares está alterada durante el periodo del parto. Estos investigadores han especulado que la función atenuada de los neutrófilos contribuye al aumento en la incidencia de la mastitis post-parto. Estudios paralelos y subsecuentes han demostrado que la incidencia de mastitis clínica es mayor en vacas cuyos neutrófilos presentan baja actividad del estallido respiratorio y que la severidad de la mastitis por *E. coli* depende tanto de la velocidad con la que se movilizan los PMNs desde la sangre periférica hacia la glándula mamaria, como de la actividad opsónica dentro de la misma (Mallard et al., 1998).

Además, un desequilibrio entre la producción de radicales libres oxígeno reactivos por los neutrófilos y los dispositivos de eliminación puede contribuir a los desórdenes del parto en las vacas lecheras (Miller et al., 1993).

De acuerdo con la Federación Internacional Lechera (IDF), la mastitis se define como una inflamación de uno ó más cuartos mamarios, debida frecuentemente a una infección bacteriana. En algunos casos esta inflamación va acompañada de signos clínicos (signos pronunciados de inflamación mamaria y enfermedad sistémica) y se denomina mastitis clínica. En otros casos los signos de mastitis son imperceptibles por observación directa y entonces se diagnostica como mastitis subclínica, basada en la presencia de bacterias y modificaciones citológicas de la leche (Djabri et al., 2002).

La mastitis es la enfermedad más común entre las cabras de granjas lecheras. y su causa principal es la infección del pezón debida a máquinas de ordeño desajustadas y contaminadas, condiciones sanitarias deficientes, deficiencias en el sellado de los pezones después del ordeño, deficiencias en la separación de animales enfermos crónicos, malos tratamientos a las cabras enfermas, etc. La mastitis es infecciosa y altamente contagiosa, con una morbilidad considerable y una mortalidad baja (Oliszewski et al., 2002).

Tanto en vacas como en cabras, la inflamación de la glándula mamaria usualmente debida a una infección microbiana, es la causa principal de que los productores lecheros pierdan millones de dólares cada año. Las pérdidas son causadas por varios factores, tales como disminución en la producción de leche, cambios marcados en la composición que reducen su calidad, costosos tratamientos y mayor riesgo de deshecho temprano de los animales (Hisaeda et al., 2001; Riffon et al., 2001; Sargeant et al., 2001; Tsenkova et al., 2001; Yazdankhah et al., 2001; Zadoks et al., 2001c)

El ganado lechero pasa continuamente por fases de gestación, parto y lactancia, condiciones de mucho estrés, con estados de baja inmunidad, lo cual puede ser una de las causas que hacen difícil la solución de este problema (Hisaeda et al., 2001)

Los microorganismos más importantes que causan mastitis en el ganado vacuno son estafilococos (Sato et al., 1999; Riollet et al., 2000; Tollersrud et al., 2000; Zhang y Maddox, 2000; Aguilar et al., 2001; Akineden et al., 2001; Phuektes et al., 2001a; Riollet et al., 2001; Rivas et al., 2001b; Schlegelova et al., 2001; Stephan et al., 2001; Takeuchi et al., 2001; Younan et al., 2001; Young et al., 2001; Zadoks et al., 2001b; Devriese et al., 2002; dos Santos Nascimento et al., 2002; Middleton et al., 2002; Sánchez et al., 2002; Persson Waller et al., 2003), estreptococos (Boddie y Nickerson, 1997; Boddie et al., 1997; Waage et al., 1999; Phuektes et al., 2001a; Phuektes et al., 2001b; Song et al., 2001; Yazdankhah et al., 2001; Younan et al., 2001; Zadoks et al., 2001a; Zadoks et al., 2001b; Hillerton y Kliem, 2002) y bacterias coliformes (Döpfer et al., 2000; Riollet et al., 2000; Bradley y Green, 2001; Correa y Marin, 2002; Kaipainen et al., 2002; Khan et al., 2002). No obstante también se aislan frecuentemente organismos de los géneros *Enterococcus* (Yazdankhah et al., 2001), *Pseudomonas* (Contreras et al., 1997; Las Heras et al., 1999; Berriatua et al., 2001), *Arcanobacterium pyogenes* (Waage et al., 1999; Waage et al., 2000), y *Pasteurella* spp. (Wilson et al., 1997). *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum* y *Mycoplasma canadense*, son también agentes conocidos como causantes de mastitis contagiosa en el ganado (Wilson et al., 1997; Butler et al.,

2000) y en fechas recientes se ha demostrado que también los virus pueden participar como agentes productores de mastitis (Wellenberg et al., 2000; Hotzel y Cheevers, 2001; Wellenberg et al., 2001; Wellenberg et al., 2002), además de algunas algas que han sido aisladas de bovinos con mastitis (Roesler et al., 2001; Roesler y Hensel, 2003).

En cabras, el *Staphylococcus aureus* es un patógeno clínico importante, pero los estafilococos coagulasa negativos (CNS) son los de mayor prevalencia en las mastitis subclínicas (más del 50% en la mayoría de los estudios). Las rutinas incorrectas con las máquinas de ordeño están involucradas con frecuencia en la alta prevalencia de CNS, así mismo los estreptococos y los bacilos Gram-negativos (GNB) son patógenos intramamarios importantes, pero no muy frecuentes en esta especie, y están asociados con condiciones higiénicas pobres en el alojamiento y la sala de ordeño, sin embargo, la menor prevalencia de GNB en las mastitis caprinas comparada con las de vacas, hace pensar que existen factores fisiológicos y ambientales que pudieran proteger a las cabras de las infecciones por GNB. Otros patógenos que afectan la glándula mamaria caprina son *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus spp.*, *Clostridium perfringens*, *Nocardia asteroides* y lentivirus (virus de la artro-encefalitis caprina) (Contreras et al., 2003).

Desde un punto de vista terapéutico, el diagnóstico diferencial de la mastitis clínica es esencial, ya que los signos clínicos del animal son normalmente insuficientes para predecir el agente etiológico, además, el tratamiento óptimo difiere para cada uno de los tipos de mastitis (Yazdankhah et al., 2001).

Factores de susceptibilidad a la mastitis

La capacidad de los animales para resistir a las infecciones mamarias varía como resultado de la virulencia microbiana, la capacidad disminuida de los neutrófilos fagocíticos en la leche, las variaciones individuales entre animales y entre glándulas mamarias en particular, el estado de la lactancia y de las situaciones fisiológicas de estrés tales como el parto (Silva et al., 1989). Todo esto concuerda con lo expuesto por Casadevall y Pirofski (2000) en el análisis que hacen sobre la relación patógeno hospedero. *“La evolución de una infección representa un proceso continuo y la ocurrencia de una situación u otra es el resultado de la interacción entre el hospedero y los factores microbianos para cada microbio en particular y para cada hospedero en particular. Esta interacción permite que en algunos hospederos los microbios sean comensales en y en otros causen enfermedad, esto es que la cualidad de la virulencia microbiana y la distinción entre los patógenos y los no patógenos es críticamente dependiente de los factores del hospedero”*, lo que explica el hecho muy conocido de que en períodos de inmunosupresión aumenta la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas.

Las investigaciones que se han venido realizando con el fin de evitar las infecciones intra mamarias se han enfocado ampliamente en los patógenos que las producen, con la finalidad de atacarlos y prevenirlos. No obstante, a pesar de los esfuerzos que se han hecho para lograrlo, el control de la mastitis es aún un problema en el manejo de los rebaños. En hatos lecheros, el ganado presenta continuamente fases de gestación, parto y lactancia, lo cual ocasiona

estrés que conduce a bajos estados inmunológicos que pueden ser una de las causas que dificulten la solución de este problema (Hisaeda et al., 2001).

Van Werben *et al.* (1997), mencionan que en hatos con altos perfiles de riesgo, algunas vacas nunca desarrollan la enfermedad, en cambio, en rebaños con bajo perfil de riesgo, las vacas si la desarrollan, lo que indica que hay factores intrínsecos que juegan un papel importante en la susceptibilidad individual a la mastitis. Es por eso que a últimas fechas, el enfoque se ha dirigido hacia los componentes del sistema de defensa de los individuos, ya que si se logra mejorar el estado inmunológico, los animales podrán controlar a los patógenos antes de que estos produzcan daño.

Existe una gran variedad de mecanismos para proteger a un individuo de los efectos dañinos de los organismos patógenos. La resistencia innata a enfermedades infecciosas, refleja los atributos fisiológicos de un animal que lo hacen más o menos susceptible al desarrollo de enfermedades causadas por un patógeno en particular. Los genes que regulan la respuesta inmune a un antígeno pueden ser clasificados en aquellos que controlan la calidad y la cantidad de la respuesta innata (tales como los que codifican opsoninas¹ inespecíficas, receptores y enzimas involucradas en la fagocitosis), y los que controlan la especificidad de la respuesta inmune adaptativa (tales como el complejo mayor de histocompatibilidad [MHC por sus siglas en inglés], los receptores de las células T y los genes de las inmunoglobulinas) (Kelm et al., 1997).

¹ Inmunoglobulinas y otros factores que favorecen la fagocitosis

Inmunidad de la glándula mamaria.

La glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa que pueden ser clasificados en dos distintas categorías: inmunidad innata e inmunidad específica. 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 se aumenta por exposición repetida al mismo daño. Las respuestas inespecíficas o innatas de la glándula mamaria están mediadas por la barrera física del extremo del pezón, macrófagos, neutrófilos y células NK (asesinas naturales), y por ciertos factores solubles.

La primera línea de defensa en contra de las infecciones mamarias es el canal del pezón. Las bacterias que logran pasar esta barrera y entran a la cisterna del pezón, se encuentran con la segunda línea de defensa: los leucocitos fagocitadores. Los fagocitos compuestos por macrófagos y neutrófilos, ingieren y matan a los patógenos de la mastitis. Después de la fagocitosis, los macrófagos liberan quimioatrayentes que reclutan neutrófilos en forma rápida y masiva hacia la glándula infectada (Paape y Capuco, 1997; Bouchard et al., 1999a).

Los antibióticos pueden matar a la mayoría de los patógenos causantes de mastitis, sin embargo, no pueden prevenir la reacción inflamatoria dirigida por los leucocitos del hospedero contra la bacteria intrusa. Esta reacción generalmente produce daños irreversibles en el epitelio mamario y una

permanente reducción en la producción de leche. Un medio para disminuir los efectos adversos de la mastitis consistiría en modular el sistema inmune de la glándula mamaria para preservar la integridad del epitelio mamario, y por consiguiente, la cantidad de leche producida (Bouchard et al., 1999b).

El sistema inmune adquirido o específico reconoce determinantes específicos de un patógeno y así facilita la eliminación selectiva. El reconocimiento de factores patogénicos 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 por exposiciones repetidas a un patógeno. En la glándula mamaria, tanto la respuesta innata como la adquirida se coordinan para proporcionar una protección óptima contra las infecciones de este órgano (Sordillo et al., 1997).

La mayoría de los estudios realizados para explicar los mecanismos de defensa de la glándula mamaria contra los patógenos, se han enfocado a la inmunidad innata mediada por macrófagos, neutrófilos y células semejantes a las NK, así como factores solubles. Recientemente la atención se ha dirigido al papel de la inmunidad específica, en particular al papel que desempeñan las poblaciones de linfocitos para combatir las infecciones bacterianas de la glándula mamaria (Riollet et al., 2001).

En este trabajo se aborda la participación de un agente antioxidante (el selenio) sobre la función de los neutrófilos o polimorfonucleares durante un estado de baja inmunidad.

Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos

La migración de los leucocitos PMNs hacia el tejido de la glándula mamaria, proporciona la primera línea inmunológica de defensa contra las bacterias que penetran la barrera física del canal del pezón. La evasión de los neutrófilos de defensa proporciona una oportunidad a las bacterias invasoras para establecerse (Paape y Capuco, 1997).

Los leucocitos PMNs y los macrófagos son las células fagocíticas funcionales del organismo. Los macrófagos, junto con las células epiteliales, inician la respuesta inflamatoria necesaria para eliminar las bacterias invasoras, liberando quimioatrayentes² para el rápido reclutamiento de PMNs hacia el foco de infección. El inicio de la reacción inflamatoria es causado por la producción y liberación de factor de necrosis tumoral (NFT), interferones (IFNs) e interleucinas (IL). Estas complejas interacciones dan como resultado una acumulación de PMNs en el sitio de la infección (Paape et al., 2002).

La fagocitosis por PMNs es la defensa más efectiva contra infecciones bacterianas. Para que esta ocurra, el reconocimiento entre bacterias y PMNs es dirigido por componentes del complemento e inmunoglobulinas. Una vez que los componentes del complemento y las inmunoglobulinas se unen a los receptores sobre la superficie de los PMNs, las células se vuelven activas y se inicia la explosión oxidativa. Esta respuesta va seguida de un incremento en el

² Sustancias químicas que ejercen un efecto de quimioatracción o quimiotaxis. Generalmente del tipo Citocinas.

consumo de oxígeno por la vía metabólica de la hexosa monofosfato³, comúnmente conocida como "estallido respiratorio". El estímulo a la NADPH oxidasa de la membrana plasmática inicia la actividad de la vía hexosa monofosfato. Cuando la membrana plasmática de los PMNs es perturbada, se liberan grandes cantidades de ión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El O_2^- y el H_2O_2 formados sobre la superficie celular y la membrana fagocítica interactúan para formar el radical hidroxilo (OH^-) y el oxígeno singular (O^-), componentes claves de los mecanismos destructores oxígeno-dependientes de los PMNs. Cuando los fagosomas⁴ que contienen a los microorganismos ingeridos se fusionan con los gránulos azurófilos o primarios del PMN, se libera mieloperoxidasa, enzima que cataliza a partir de los iones Cl^- y el H_2O_2 la formación de ión hipoclorito ($HClO^-$) un agente fuertemente oxidante (Paape et al., 2002; Paape et al., 2003). Mayor información sobre todos estos radicales se trata en el apartado de estrés oxidativo.

Los potentes oxidantes señalados anteriormente, destruyen no solo algunas de las bacterias, sino también algunos de los tejidos que se encuentran en el área cercana. Para los PMNs esta es su misión final y después de la ingestión y liberación de los reactivos la mayoría de ellos perecen. Enseguida, los macrófagos llegan a través de los poros de los capilares. El daño a los tejidos puede ser controlado por la inducción de una muerte celular programada (apoptosis) de los PMNs y su eliminación por macrófagos. De esta manera, una

³ Es una vía metabólica alterna a la glicólisis, en la cual se utiliza el NADP como aceptor de electrones en vez del NAD.

⁴ Vesículas fagocíticas.

vez que el PMN ha sido ingerido por el macrófago los reactivos peligrosos quedan encerrados en el PMN agonizante evitando su liberación a los tejidos cercanos, minimizando así el posible daño (Paape et al., 2002).

En la glándula mamaria, la primera línea de defensa inmunológica contra bacterias que penetran la barrera física del canal del pezón está formada por los PMNs (Paape y Capuco, 1997; Paape et al., 2003) , que protegen a la glándula mamaria por medio de la fagocitosis y la muerte intracelular, debido a su capacidad para fagocitar y matar bacterias opsonizadas y no opsonizadas mediante el empleo de enzimas bactericidas y radicales libres oxidantes (Aguilar y Iturralde, 2001).

En los bovinos, el funcionamiento propio del sistema de neutrófilos es crítico para la prevención de los efectos tanto locales como sistémicos de la infección sobre el tejido secretor mamario, existiendo una relación inversa entre la capacidad de la ubre para reclutar neutrófilos y el establecimiento de una infección intramamaria. Las vacas que curan en forma espontánea tienen respuestas rápidas y abundantes de neutrófilos en leche, en cambio aquellas en que no hay respuesta o la respuesta de los neutrófilos es lenta, sucumben a formas hiperagudas o severas de mastitis. En algunos casos, el nivel de reclutamiento de los neutrófilos se asocia también con la capacidad que tienen las vacas para restablecer la producción de leche en las glándulas infectadas (Burton y Erskine, 2003).

La diapédesis de los PMNs hacia la glándula mamaria utiliza las reservas de energía que éstos requieren para la fagocitosis y destrucción de los patógenos

invasores, ocasionando una disminución en la fagocitosis y en la actividad del estallido respiratorio. A su vez, en cuanto entran a la glándula mamaria, los PMNs ingieren grasa y caseína, lo cual disminuye la fagocitosis de patógenos invasores. Como consecuencia, se requiere un gran número de PMNs para prevenir la infección de la glándula mamaria. La protección ofrecida por los PMNs en contra del establecimiento de infecciones en la glándula mamaria bovina es mucho mejor cuando los PMNs están presentes en concentraciones superiores a los 500 000/mL de leche (Paape et al., 2003).

Los PMNs de la leche son menos efectivos para fagocitar que los PMNs de sangre. Esta ineficiencia es atribuida en parte a las bajas reservas de energía en forma de glucógeno almacenado, porque los PMNs de leche contienen 38% menos glucógeno que los PMNs sanguíneos. Para una fagocitosis máxima, el PMN requiere una gran cantidad de membrana plasmática para poder formar los pseudópodos necesarios para atrapar y englobar a las bacterias. La reducción de la fagocitosis por los glóbulos de grasa de la leche y la caseína, se atribuye a la internalización de la membrana plasmática que se emplea para formar fagosomas que contienen grasa y caseína. La muerte intracelular de las bacterias fagocitadas es inhibida por los componentes de la leche debido a la pérdida de lisosomas que se fusionan con los fagosomas que contienen grasa y caseína en lugar de los fagosomas que contienen a las bacterias (Paape et al., 2003).

El estímulo de la lactancia o el ordeño inducen la migración dirigida de neutrófilos hacia el tejido mamario. Por tanto, la glándula mamaria estéril se

abastece con una constante fuente de neutrófilos; sin embargo, una vez en el lumen de los alveolos, la ingestión de grasa y caseína por los neutrófilos ocasiona pérdida de las funciones fagocítica y bactericida y los conduce a la muerte. El ordeño elimina los neutrófilos alterados, que son reemplazados por neutrófilos sanos, manteniendo así la defensa contra las infecciones bacterianas. Este fenómeno podría explicar en parte la incidencia reducida de mastitis clínica en vacas ordeñadas cuatro veces al día en comparación con las ordeñadas dos veces al día (Paape y Capuco, 1997).

Estructura fina de los PMNs.

La estructura fina de los PMNs se ha definido cuidadosamente. La célula está delineada por una membrana plasmática que tiene buen número de receptores funcionalmente importantes. Entre estos se incluyen la L-selectina y la β 2-integrina, moléculas de adhesión asociadas con la unión de los PMNs a las células endoteliales y que son importantes para la migración hacia los sitios de infección. Los receptores de membrana para la fracción Fc de las inmunoglobulinas de las clases IgG₂ e IgM y para las fracciones C3b del complemento son necesarias para mediar la fagocitosis de las bacterias invasoras. Los PMNs apoptóticos o los que están muriendo expresan receptores que los marcan para ser distinguidos por los macrófagos (Paape et al., 2002)

La característica mas prominente de los PMNs es su núcleo multilobulado (ver figura 1). El núcleo multilobulado es importante porque le permite al PMN levantar sus lóbulos nucleares en una fina línea, permitiendo la migración rápida

entre las células endoteliales, a diferencia de los macrófagos, que tienen un enorme núcleo en forma de herradura que hace más difícil su migración a través de las células endoteliales.

Dentro del citoplasma de los PMNs hay vacuolas de glucógeno, que constituyen el 20% de la célula en base a su peso seco y numerosos gránulos unidos a la membrana que son empleados por la célula para matar a las bacterias. Los PMNs contienen gránulos azurofílicos y gránulos específicos, además de un tercer tipo de gránulos más grandes, densos y más numerosos que los anteriores, los cuales contienen lactoferrina, esta se encuentra también en los gránulos específicos, sin embargo, no contienen componentes comunes a los de los gránulos azurófilos; en su lugar, este tercer tipo de gránulos contiene un grupo de proteínas altamente catiónicas y son el almacenamiento exclusivo de poderosos componentes bactericidas oxígeno-independientes.

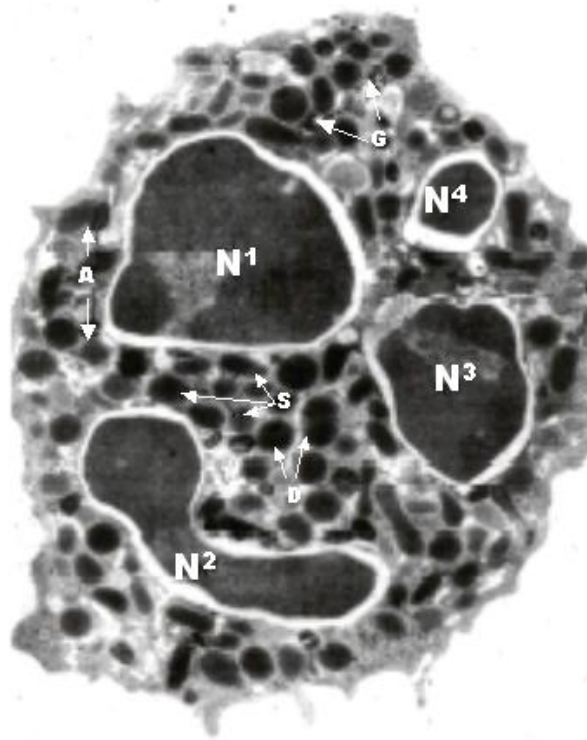


Figura 1. Micrografía de microscopio electrónico de transmisión de un leucocito polimorfonuclear neutrófilo bovino (PMN) aislado de sangre. El leucocito está limitado por la membrana plasmática y contiene porciones de un núcleo multilobulado (N1-N4), gránulos de glucógeno (G), gránulos específicos (S), gránulos azurofílicos (A) y grandes gránulos densos (D). Los gránulos azurofílicos están teñidos mas 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) (Paape et al., 2002).

El mecanismo antibacteriano mas importante derivado de los gránulos azurofílicos es el sistema mieloperoxidasa/hialuro de peróxido de hidrógeno. La mieloperoxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno y iones haluro mata a las bacterias (Paape et al., 2002).

Migración de PMNs desde la sangre hacia la glándula mamaria

El ciclo de vida de los PMNs bovinos es breve. En la médula ósea, la célula requiere de 10-14 días para madurar. Después de su maduración, los PMNs

pueden ser almacenados por unos cuantos días adicionales en la médula ósea. Los PMNs maduros abandonan el compartimento hematopoyético de la médula ósea para entrar en el seno vascular, viajando vía los canales de migración a través del endotelio. Los PMNs circulan en la corriente sanguínea brevemente (vida media de 8-9 h), abandonan la corriente sanguínea por diapédesis entre las células endoteliales y entran a los tejidos, donde funcionan como fagocitos por 1-2 días. En los animales sanos, la producción y destrucción de PMNs está totalmente regulada, lo cual mantiene constante el número en sangre, leche y tejidos. El flujo de PMNs hacia la glándula mamaria ocurre en bajos niveles actuando como vigilantes inmunológicos, pero se incrementa rápidamente en respuesta a una invasión bacteriana (Paape et al., 2002).

Durante la mastitis los quimioatrayentes inflamatorios guían a los PMNs hacia el foco de infección. Los potentes quimioatrayentes para los PMNs bovinos incluyen el C5a, un producto activo del rompimiento de la fracción 5 del complemento (C5), varios lipopolisacáridos (LPS) y las interleucinas 1, 2 y 8 (IL-1, IL-2, IL-8). Estos quimioatrayentes se unen a receptores específicos que se encuentran en la membrana plasmática de los PMN. Antes de la adhesión de estas células a las superficies endoteliales ocurre una extravasación de PMNs activados. Esto se completa con la expresión de moléculas de adhesión específicas de membrana, entre las cuales las más importantes son las moléculas de la familia CD11/CD18, que sobre la superficie endotelial se unen a las moléculas de adhesión del endotelio intercelular (i.e. ICAM-1 e ICAM-2) y a las moléculas de adhesión de los leucocitos endoteliales (ELAM-1) (Paape et

al., 2002). Después de unirse a estas moléculas, los PMNs abandonan la sangre circulante y están listos para funcionar como fagocitos en el sitio de la infección. En la mastitis bovina, el control y el desarrollo de la infección intra mamaria y la severidad de la enfermedad, dependen del número de PMNs circulantes y de su efectiva adhesión, migración, opsonización, fagocitosis y muerte intracelular (Paape et al., 2002)

El mecanismo de acción de la máquina de ordeño también causa migración de PMNs desde la sangre y es importante para su supervivencia en la glándula mamaria. Inmediatamente después del ordeño, las concentraciones de PMNs en sangre de la vena abdominal subcutánea disminuyen, pero las concentraciones en la linfa de la glándula mamaria y en leche aumentan.

La glándula mamaria normalmente es estéril y está provista con millones de PMNs para propósitos de defensa. Además, la leche recién sintetizada induce el movimiento de PMNs recién migrados desde los alveolos hacia el sistema de ductos de la glándula mamaria. Sin embargo, la ingestión de glóbulos de leche y caseína por los PMNs causa una liberación de gránulos citoplásmicos, lo cual está asociado con una reducción en la actividad bactericida y los leucocitos se redondean, eliminando los pseudópodos que necesitan para poder fagocitar. El ordeño remueve los PMNs alterados, los cuales son reemplazados por PMNs sanos, mejorando así la defensa contra la infección bacteriana (Paape et al., 2003).

Las actividades fagocítica y bactericida de los neutrófilos son componentes importantes de la inmunidad celular a las infecciones microbianas y pueden ser

diferentes para distintos microorganismos. La fagocitosis es promovida por opsoninas, particularmente anticuerpos específicos y ciertas fracciones del complemento. y sus eventos estimulan procesos metabólicos en los neutrófilos que conducen a la activación de mecanismos microbicidas oxígeno-dependientes y oxígeno-independientes (Silva et al., 1989). En la vía dependiente de oxígeno participan los radicales libres oxígeno reactivos y la vía no dependiente de oxígeno corresponde a las enzimas hidrolíticas que se encuentran en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos (Paape et al., 2002).

En la figura 2 se describen y se aprecian esquemáticamente las funciones que llevan a cabo los neutrófilos para la eliminación de los patógenos: Vigilancia, marginación, migración, diapédesis, fagocitosis y digestión del agente extraño.

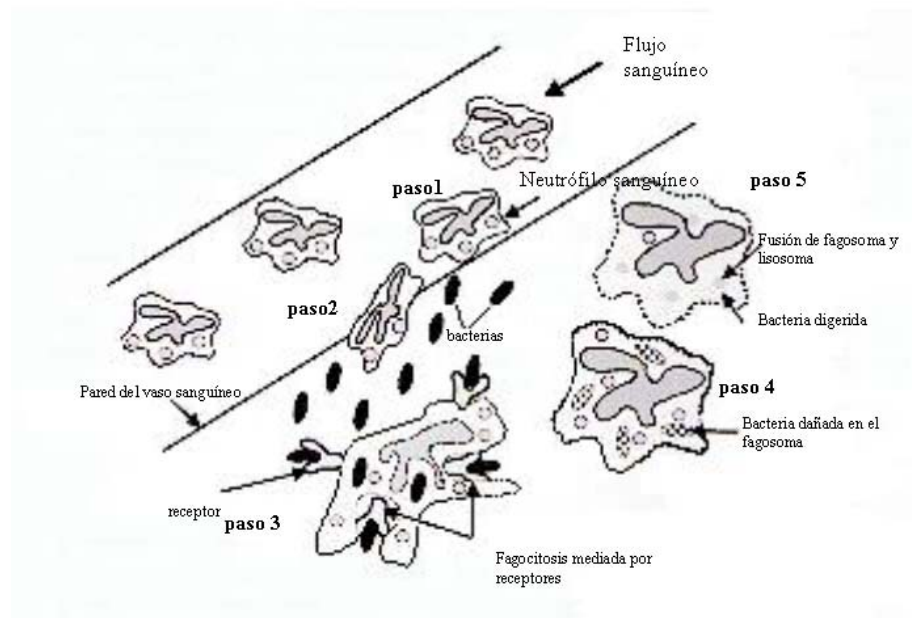


Figura 2: Pasos que siguen los neutrófilos para llevar a cabo las funciones de vigilancia inmunológica y destrucción de agentes patógenos. Los neutrófilos circulantes vigilan continuamente los tejidos en busca de señales de lesión o inflamación, marginándose en el endotelio de los capilares sanguíneos (paso 1) Cuando los neutrófilos marginales detectan la infección en los tejidos cercanos, las células son activadas para migrar a través de las paredes del vaso sanguíneo con dirección al foco de infección (paso 2). La migración activa a los neutrófilos a iniciar la fagocitosis mediada por receptores hacia el patógeno infectante internalizando los microorganismos en vesículas llamadas fagosomas (paso 3). La fagocitosis activa el “estallido respiratorio” (paso 4) y después la desgranulación (paso 5). Durante el estallido respiratorio los neutrófilos generan una variedad de especies oxígeno reactivas que originan un daño oxidativo a los patógenos fagocitados (paso 4). Durante la desgranulación el fagosoma interior se fusiona con los lisosomas para finalizar la destrucción del patógeno por medio de mecanismos oxígeno independientes (paso 5). Todos estos pasos deben trabajar rápida y efectivamente para que la infección a la glándula mamaria se resuelva inmediatamente. (Burton y Erskine, 2003)

Células somáticas

La cuenta de células somáticas (SCC por sus siglas en inglés) mide todos los tipos celulares de la leche, incluyendo los eosinófilos, los linfocitos, los macrófagos, los neutrófilos y las células epiteliales. Sin embargo, en la SCC no

se hace distinción entre los tipos de células presentes en la leche; además la SCC varía según el tiempo y la frecuencia de la ordeña, el estado de lactación y la estación del año (Pillai et al., 2001), mientras que en cabras, los factores no infecciosos tales como el número de partos, el estado de lactación, la estacionalidad y la producción de leche también tienen relación con las cuentas de SCC aumentadas. Otros factores que se ha reportado que incrementan la SCC en cabras son el estro, la vacunación, el cambio en la dieta y el cambio en la rutina de ordeño, ya que estos factores dan como resultado un estrés fisiológico, al cual las cabras son muy sensibles, produciendo una disminución en la producción de leche que puede ser la explicación en el incremento de las SCC (Paape et al., 2001).

La SCC se ha tomado como el indicador mas ampliamente aceptado del estado de la leche de vacas, sin embargo, el manejo de la prueba debe ser diferente para leche de cabras, debido a que en estas, la presencia de muchas partículas citoplásmicas es el resultado de la secreción apócrina de leche, las cuales no se presentan en leche de vacas, ya que las ubres de las vacas tienen secreción merócrina (Paape et al., 2001). La secreción apócrina ocasiona que las partículas citoplásmicas se derramen hacia la leche a partir de la porción apical de las células secretoras mamarias (ver figura 3). Las partículas citoplásmicas tienen un tamaño semejante al de las células somáticas, pero no contienen DNA, sin embargo, por su tamaño se pueden confundir con células, ocasionando que en leche de cabras se obtenga una cuenta errónea cuando se

emplean métodos de conteo de partículas (Paape y Capuco, 1997; Haenlein, 2002).

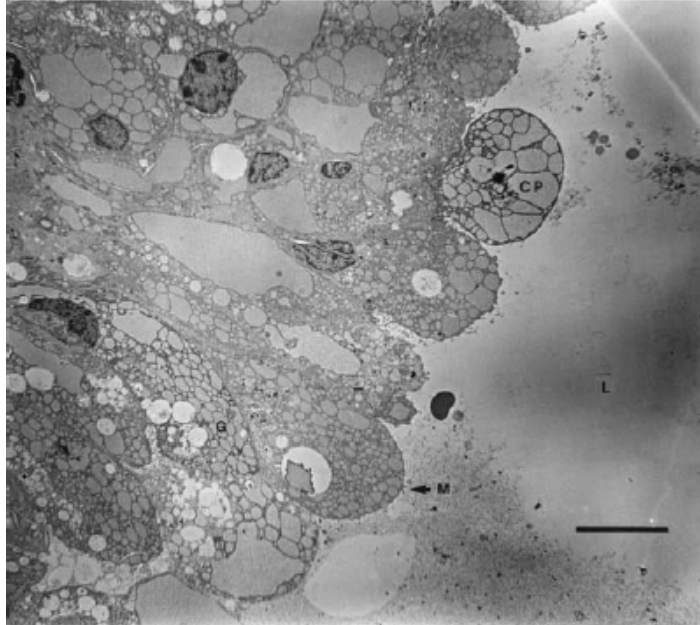


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión tomada de una sección de una biopsia de glándula mamaria. El lumen alveolar está limitado por células epiteliales cuyo ápice tiene microvellosidades externas y acumulación granular interna en el retículo endoplásmico, el cual parece encontrarse en las partículas citoplásmicas (CP) de la leche. La barra corresponde a 10 μ m (Paape y Capuco, 1997).

La SCC en leche de vacas es indicativa del número de leucocitos presentes en leche, los cuales se incrementan en condiciones de mastitis. La leche de cabra por el contrario, contiene debido al proceso de secreción apócrina, muchas partículas celulares no leucocíticas, que carecen de DNA o núcleo y que nada tienen que ver con las condiciones de la mastitis. Por lo tanto, sólo los métodos que identifiquen específicamente el DNA pueden estimar realmente el número de leucocitos y el estado de la glándula mamaria a través de la leche en las cabras (Haenlein, 2002).

En ovejas la secreción láctea es también de naturaleza apócrina, y las partículas citoplásmicas son de tamaño similar a las células somáticas que forman parte de la leche, sin embargo, su concentración es 10 veces menor que en la leche de cabras, esto es que mientras que en leche de oveja se encuentran 15×10^3 partículas /ml en promedio, en leche de cabras el promedio es de 150×10^3 (Paape et al., 2001):

Los investigadores han monitoreado las subpoblaciones de leucocitos de la leche normal durante el ciclo de lactancia, para determinar si los perfiles celulares cambian con riesgo de desarrollar infecciones intra mamarias. Resumiendo los estudios, es claro que el reclutamiento normal de leucocitos hacia la leche es menor una semana después del parto y en la lactancia temprana (SCC~ 1.5×10^5 células/ml de leche) que en la mitad de la lactancia (SCC~ 3.5×10^5 células/mililitro de leche), en la lactancia tardía (SCC~ 1×10^6 células/mL de leche), el período seco temprano (SCC ~ 2×10^6 células /mL de secreción), durante el estadio de involución (SCC ~ 3×10^6 células/mL de secreción), o dos semanas antes del parto (SCC en leche > 1×10^7 /mL de secreción). En las ubres sanas, un aumento en la cuenta de neutrófilos en leche conlleva un aumento paralelo en las cuentas de linfocitos T y la SCC de la leche aumenta con el progreso de la lactancia. La presencia de neutrófilos y células T se relaciona directamente con la SCC global de la leche e inversamente con el riesgo de infección intra mamaria. (Burton y Erskine, 2003). Ver Figura 4.

En leche de cabras, las SCC van desde 50 hasta $1\ 000 \times 10^3$ /mL y son influenciadas por el estado de lactación y por el número de partos. Los

leucocitos son el tipo celular predominante, sin embargo, también se ha observado una alta proporción de células epiteliales en leche de cabras, que están asociadas con la secreción apócrina de la leche. Estas células exhiben características de células epiteliales alveolares diferenciadas y viables en las mujeres, vacas y cerdas, pero no en las cabras (Boutinaud et al., 2002).

Debido a que la secreción de leche en las cabras es principalmente apócrina, las partículas citoplásmicas se derraman hacia la leche a partir de la porción apical de las células secretoras mamarias (Fig. 3). El número de partículas citoplásmicas en la leche de cabras no infectadas anda en los rangos de 71 a 306 x 10³ /ml y de 98 a 231 x 10³ / ml para las glándulas infectadas. A pesar de que la mayoría de estas partículas son anucleadas, se ha observado que aproximadamente el 1% contienen fragmentos nucleares (Paape et al., 2001).

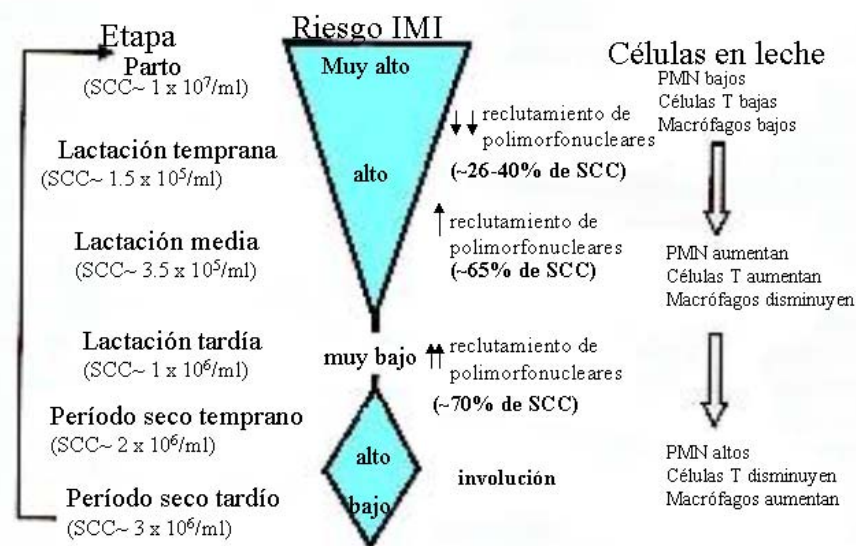


Figura 4: Número y tipo de células somáticas en leche durante las distintas etapas del ciclo de lactación. (Burton y Erskine, 2003).

Los tipos celulares presentes en la leche deben ser reconocidos porque la leche no infectada contiene principalmente macrófagos (60%) y linfocitos (28%), con unos cuantos leucocitos polimorfonucleares (5 a 12%). En la leche de vacas con mastitis, el porcentaje de neutrófilos (PMNs) se incrementa considerablemente (arriba de 90%). Por lo tanto, además de la SCC, puede resultar benéfico conocer los tipos de células inflamatorias presentes en la leche (Pillai et al., 2001). Esto se logra por medio de la cuenta diferencial de leucocitos en leche.

La SCC en leche de cabras no infectadas es más altas que las de vacas y ovejas no infectadas. En promedio, las SCC de las glándulas mamarias de cabras libres de infecciones intramamarias (IMI) van de 270 a 2000 x 10³/ml y de 659 a 4213 x 10³ /ml en glándulas infectadas. A diferencia de la leche de vacas y ovejas, los PMNs son el principal tipo celular en leche de glándulas mamarias de cabras infectadas y no infectadas (Paape et al., 2001).

En animales libres de IMI, los PMN constituyen del 45 al 74% de las células somáticas de la leche de cabra y el 71 al 86% de las glándulas mamarias infectadas. Los macrófagos comprenden del 15 al 41% de las células somáticas de los medios no infectados y 8 a 18% de los infectados. Los linfocitos comprenden del 9 al 20% de las células somáticas en glándulas no infectadas y del 5 al 11% de las glándulas infectadas. Las células epiteliales representan una pequeña parte de las células de la leche de cabras; pero la identificación por microscopio de luz se dificulta debido a la presencia de partículas

citoplásmicas en la leche de cabra. Se ha reportado que las células epiteliales comprenden del 1 al 6% de las células totales (Paape et al., 2001).

La citología manual de leche (cuenta diferencial de leucocitos), es la técnica estandarizada que se emplea para determinar la presencia o ausencia de un proceso inflamatorio en la leche de bovinos con baja SCC. El empleo de la cuenta diferencial de células en el diagnóstico de la mastitis se propuso desde hace dos décadas. Sin embargo, el tiempo que emplea así como la experiencia que se requiere por parte de quien evalúa las citologías de los leucocitos en leche, pueden ser impedimentos para que sea una práctica común en el diagnóstico de la mastitis bovina (Rivas et al., 2001a).

El estrés oxidativo

A pesar de que el oxígeno es un elemento esencial para todos los organismos aeróbicos, este produce en ellos toxicidad. A esto se le ha denominado "la paradoja del oxígeno" y ha desarrollado un creciente interés, dado el potencial dañino de los metabolitos del oxígeno en relación con enfermedades humanas y de animales.

El término "metabolitos oxígeno reactivos" (ROM por sus siglas en inglés) ha sido aplicado para los radicales libres centrados en el oxígeno y sus metabolitos. Algunos ROM se producen de manera endógena durante los procesos metabólicos normales, pero sus cantidades se pueden aumentar marcadamente por factores exógenos, que incluyen las radiaciones solares, las toxinas fúngicas y los pesticidas (Miller et al., 1993), así como las condiciones de estrés.

La deficiencia de sustancias protectoras naturales o la exposición excesiva a estimuladores de la producción de ROM puede dar como resultado un estrés oxidativo, el cual ocurre cuando los pro oxidantes exceden la capacidad de los antioxidantes. La participación del estrés oxidativo en la etiología de ciertos desórdenes del ganado lechero ha sido sugerida dada la reducción en retenciones placentarias y mastitis cuando el ganado es suplementado con antioxidantes como la vitamina E y el selenio (Miller et al., 1993).

Los ROM son productos inevitables de los procesos metabólicos (ver figura 5) y no siempre son dañinos. El super óxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), están involucrados fisiológicamente en la química de muchas enzimas y son empleados por las células fagocíticas para matar a las bacterias. Sin embargo, un desequilibrio entre la producción de ROM y los dispositivos de seguridad, puede iniciar reacciones oxidativas en cadena y peroxidación de los lípidos (ver cuadro 1).

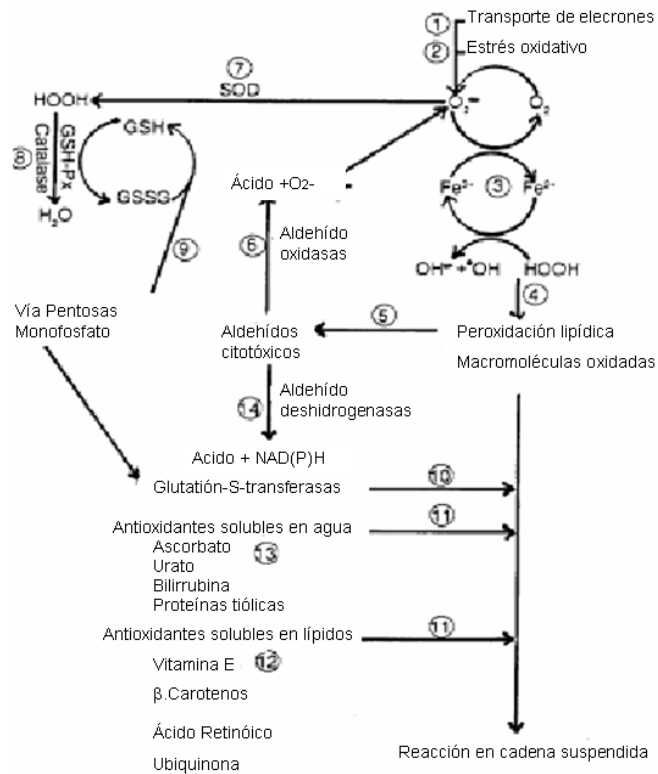


Figura 5. Sistemas de protección contra los metabolitos oxígeno reactivos. 1) El super óxido se genera durante el metabolismo normal. 2) Los factores exógenos que contribuyen a un estrés oxidativo incluyen desequilibrios dietéticos, enfermedades, contaminantes ambientales y radiaciones solares. 3) El super óxido reduce el Fe^{+3} , obligándolo a entrar en reacciones del tipo Fenton, las cuales producen radicales hidroxilo. 4) Los radicales hidroxilo extremadamente activos atacan macromoléculas e inician cadenas de reacciones peroxidativas. 5) Los aldehídos citotóxicos son productos finales de la peroxidación lipídica. 6) Cuando los tejidos son destruidos, las deshidrogenasas de los aldehídos se convierten en oxidasas aldehídicas, las cuales generan super óxido. 7) Las super óxido dismutasas (Mn, Cu y Zn) convierten los super óxidos a peróxidos. Esta conversión retarda la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} , lo cual cataliza la formación de $\cdot OH$. La catalasa (Fe) y la glutatión peroxidasa (Se) convierten los peróxidos a compuestos que ya no participan en reacciones tipo Fenton. La reducción de los peróxidos se acompaña de oxidación de la glutatión reducida. 9) La glutatión reducida se puede regenerar a partir de disulfuro de glutatión (GSSG) por los equivalentes reductores provenientes del NADPH, que es generado en la vía de la pentosa monofosfato. 10) La glutatión S-transferasa conjuga al glutatión con los radicales peroxi. Esta vía se hace mas activa cuando hay deficiencia de selenio o de vitamina E. La destrucción resultante de la glutatión incrementa el consumo de equivalentes reductores compitiendo entonces con otras vías metabólicas que dependen del NADPH. 11) Los antioxidantes interruptores de cadena interrumpen las cadenas peroxidativas iniciadas por metabolitos oxígeno reactivos que escaparon a la degradación enzimática. 12) La vitamina E actúa como un antioxidante interruptor de cadena reaccionando directamente con los radicales libres. A pesar de que la vitamina E se consume cuando los radicales libres son atrapados, los equivalentes reductores son conservados, en comparación con las glutatión S-transferasas que sirven como interruptores de cadena. 13) Aunado a esto, la vitamina C regenera la vitamina E y probablemente también la glutatión y puede actuar por si sola como antioxidante soluble en agua. 14) Las aldehído deshidrogenasas convierten los aldehídos en productos menos tóxicos (Miller et al., 1993).

Cuadro 1. Inicio y propagación de metabolitos oxígeno reactivos.

Reacción	Producto
$O_2 + 1 \text{ electrón} \rightarrow O_2^-$	Super óxido
$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + HOOH$	Peróxido de hidrógeno
$O_2^- + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$	Hierro reducido
$HOOH + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}O_2 + \cdot OH$	Radical hidroxilo
$\cdot OH + RH \text{ o } LH \rightarrow H_2O + R \cdot \text{ o } L \cdot$	Ácidos grasos u otras moléculas orgánicas oxidadas
$R \cdot + LH \rightarrow RH + L \cdot$	Ácidos grasos oxidados
$L \cdot \text{ o } R \cdot + O_2 \rightarrow LO_2 \cdot \text{ o } RO_2 \cdot$	Radicales peroxi
$LO_2 \cdot + LH \rightarrow L + LOOH$	Peroxido lipídico

Tomado de: (Miller et al., 1993)

Cuando los ROM no son removidos efectiva y seguramente, el estrés oxidativo puede deteriorar la salud de los animales tanto directa como indirectamente. Los efectos directos incluyen daño peroxidativo a lípidos y macromoléculas importantes. Indirectamente los cambios inducidos por los ROM en las membranas celulares y otros componentes pueden modificar las rutas metabólicas, dando como resultado alteraciones fisiológicas y posibles patologías, además de que la deficiencia relativa de antioxidantes totales puede contribuir a deficiencias en las contracciones uterinas, además de disminuir el transporte del esperma hacia los óvulos de las ovejas y vacas no suplementadas con vitamina E y Se (Miller et al., 1993).

Normalmente, el organismo está protegido contra los ROM y sus productos tóxicos por una gran variedad de mecanismos de defensa conocidos (figura 5). Los componentes de este sistema integrado han sido clasificados como

preventivos o interruptores de la cadena e incluyen tanto a macromoléculas que captan metales como a enzimas antioxidantes.

Los catalizadores metálicos de las reacciones ROM son removidos de los fluidos extracelulares por la transferrina, la ceruloplasmina y la albúmina. Dentro de las células, las súper óxido dismutasas (SOD) que contienen Mn, Cu, y Zn, la glutatión peroxidasa que contiene Se y la catalasa que contiene Fe eliminan el O_2^- y el H_2O_2 antes de que se transformen en promotores de la química de Fenton. La reducción del peróxido se acompaña de la oxidación de la glutatión reducida (GSH), la cual puede ser regenerada por los equivalentes reductores del $NADPH_2$. A pesar de estas enzimas preventivas, algunos radicales O_2^- y H_2O_2 pueden escapar y en presencia de Fe descompartimentalizado⁵, pueden ser catalizados a más reactivos ROM (Miller et al., 1993) (todo esto se explica detalladamente en las reacciones químicas del cuadro 1).

Los antioxidantes que interrumpen la secuencia actúan antes de que se inicie una reacción en cadena. Esta clase de antioxidantes incluye a la vitamina E lipo-soluble, la ubiquinona, el β -caroteno, el ascorbato soluble en agua, la GSH y el urato. El ácido retinóico ha sido listado con los antióxicantes liposolubles, sin embargo, este no tiene actividad de rompe-cadenas (Miller et al., 1993).

Varios nutrientes esenciales están involucrados en la elaboración de estructuras que se sabe actúan en la defensa antioxidante. Los quelantes metálicos⁶, la ubiquinona, el urato, la GSH y el ascorbato pueden ser de origen endógeno o dietético, pero la dieta debe contener también adecuadas cantidades de N, S, y

⁵ También llamado Fe libre o catalítico

⁶ Agentes que atrapan metales

energía. Los elementos traza esenciales en la dieta que se requieren para las enzimas antioxidantes incluyen Mn, Cu y Zn para las SOD, Se para la glutatión peroxidasa, Fe para la catalasa y Fe más Mo para las aldehído-deshidrogenasas (Miller et al., 1993).

Tras varias observaciones, se ha sugerido que existe una respuesta inmunológica deficiente durante el estrés oxidativo. Las dietas altas en grasas insaturadas, que se sabe desde hace mucho contribuyen al estrés oxidativo, también disminuyen la competencia inmunológica. La inmunidad también se reduce cuando hay cantidades insuficientes de elementos traza esenciales, incluyendo el Se, el Cu, el Fe, el Zn y vitaminas como la A y la C, todos ellos requeridos para la defensa antioxidante (figura 4).

La infección y la reparación de tejidos son comunes aún en rebaños bien manejados y los animales pueden experimentar algún grado de disfunción inmune especialmente después del parto. El estrés, la enfermedad y la inducción de la respuesta inmune incrementan el requerimiento de nutrientes, incluyendo vitaminas y elementos traza. La insuficiencia de estos nutrientes requeridos para ambas funciones inmunidad y antioxidación, puede ocasionar deficiencias en ambos sistemas (Miller et al., 1993).

Se ha discutido ampliamente sobre el papel de los nutrientes involucrados en la inmunocompetencia tanto innata como adquirida y su participación en la resistencia a la mastitis, lo mismo que sobre los antioxidantes y su relación con la respuesta inmune y la mastitis (Miller et al., 1993).

Papel de la nutrición en la respuesta inmune.

La nutrición es un factor determinante en la evolución de las interacciones parásito-hospedero, debido a la modulación de la respuesta inmune. Además de la deficiencia de macronutrientes, las deficiencias de varios oligonutrientes (elementos que se requieren en la dieta en pequeñas cantidades, como las vitaminas y los metales traza), influyen también en el equilibrio inmune, afectando así la mortalidad y la morbilidad relacionadas con infecciones.

Las deficiencias de oligonutrientes como la vitamina A, el hierro y el zinc entre otros son muy comunes, y se ha observado que deficiencias de éstos aun subclínicas afectan funciones biológicas en los hospederos, (ver cuadro 2) siendo la respuesta inmune una de ellas (Bhaskaram, 2001).

Cuadro 2. Resumen de los efectos de los oligonutrientes sobre la inmunidad de la glándula mamaria.

Oligonutrientes	Observaciones
Se	Disminuyen la eficiencia de la función de los neutrófilos
Vitamina E	Incrementa la actividad bactericida de los neutrófilos. Disminuye la incidencia de mastitis clínica En combinación con el Se disminuye la prevalencia de IMI al parto.
Vitamina A	Disminuye la SCC Modera los niveles de glucocorticoides
β- caroteno	Incrementa la función bactericida de los fagocitos. Incrementa la proliferación mitógeno-inducida de los linfocitos.
Cu	Combate las deficiencias en la capacidad asesina de los neutrófilos. Disminuye la alta susceptibilidad a las infecciones bacterianas.
Zn	Disminuye las deficiencias en las funciones leucocitarias. Disminuye la alta susceptibilidad a las infecciones bacterianas.

Fuente: (Bhaskaram, 2001).

Varios oligonutrientes como la vitamina A, el β-caroteno, el ácido fólico, las vitaminas B12 y C, la riboflavina, el hierro, el zinc y el Se tienen funciones inmunomoduladoras y por lo tanto influyen en la susceptibilidad de los

hospederos a enfermedades infecciosas y en el curso y evolución de las mismas. Algunos de estos oligonutrientes también poseen acción antioxidante, la cual no solo regula la homeostasis inmune del hospedero, sino que altera también el genoma de los microbios, particularmente virus, lo cual resulta en graves consecuencias como el resurgimiento de antiguas enfermedades infecciosas o la aparición de nuevas infecciones (Bhaskaram, 2002).

En el cuadro 3 se presentan algunas respuestas de las funciones inmunes en respuesta a la deficiencia de algunas vitaminas (Thurnham, 1997).

Cuadro 3: Respuesta de algunas funciones inmunes a las deficiencias experimentales de vitaminas.

Marcador de la función inmune	Piridoxina	Folato	Vitamina C	Vitamina A
Tejido linfóide	Generalmente deprimido		Sin cambios	Frecuentemente atrófico
Cuentas de linfocitos	Pueden estar deprimidas	Pueden estar deprimidas	Los porcentajes de células T pueden estar disminuidos	Pueden estar disminuidos
Producción de anticuerpos después de la inmunización	Respuestas primaria y secundaria consistentemente deprimidas	Puede estar deprimida	Sin cambio	Pueden estar disminuidos
Placas esplénicas formadoras de células en respuesta a la inmunización	Deprimidas	Pueden estar disminuidas		Pueden estar disminuidas
Respuesta de linfocitos <i>in vitro</i>	Disminuida en cultivos mixtos	Puede estar deprimida		La respuesta a los mitógenos puede estar deprimida
Hipersensibilidad dérmica tardía	Deprimida aunque el mecanismo de sensibilización puede estar intacto	Puede estar deprimida	El mecanismo de recuperación suprimido, pero la sensibilización permanece prolongada	Puede estar suprimida
Supervivencia al aloinjerto	Prolongada			
Funciones de los neutrófilos	La respuesta inflamatoria puede estar disminuida	Puede estar deprimida	La quimiotaxis deficiente y la actividad metabólica reducida.	

Fuente: (Thurnham, 1997).

Papel de los elementos traza en la función inmune

En una revisión sobre la participación de los elementos traza en la respuesta inmune, Failla (2003) menciona que las investigaciones del último cuarto del

siglo 20 establecieron la importancia de una nutrición adecuada en cuanto a estos elementos, para la protección de animales y humanos contra las infecciones.

El hierro, el zinc, el cobre y el Se han recibido la atención principal de los investigadores. Los datos soportan abrumadoramente las siguientes conclusiones:

- 1) Una suplementación inadecuada de estos oligonutrientes esenciales se asocia con la supresión de numerosas actividades celulares en ambas ramas del sistema inmune, tanto el innato como el adquirido.
- 2) Las alteraciones observadas se pueden reflejar ya sea como disminución en la actividad de células individuales, como reducción en el número total de células efectoras de uno o más tejidos, o como una combinación de pocas células con capacidades disminuidas.
- 3) La magnitud de la disfunción del sistema inmune debida a la deficiencia de elementos traza puede ser suficiente para incrementar el riesgo de morbilidad y mortalidad debido a infecciones parasitarias, microbianas y virales.
- 4) Al revertir la deficiencia de los elementos traza, la inmunocompetencia se restablece.

Las células inmunes, al igual que otros tipos celulares, requieren un suplemento adecuado de elementos traza para la estructura y función de las metaloproteínas que participan en procesos internos, como la producción de energía (i.e. el hierro para los citocromos a, b y c₁, el NADH y la

deshidrogenasa succínica; el cobre para la oxidasa del citocromo c en la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias) y para la protección contra especies oxígeno-reactivas (i.e. el cobre y el zinc de la peroxidodismutasa, el Se para la glutatión-peroxidasa y el hierro para la catalasa) (Failla, 2003).

Mas aún, la producción continua de células inmunes en la médula ósea y la expansión clonal de los linfocitos en respuesta a la estimulación antigénica, requieren de suficiente hierro y zinc, elementos necesarios para la síntesis de los precursores de desoxiribonucleótidos, de la ribonucleótido-reductasa y las diversas nucleotidil-transferasas, requeridas para la replicación del DNA, y de las proteínas unidas a zinc que se requieren para la división celular.

Los elementos traza también se requieren para la actividad de varias enzimas que participan directamente en los procesos de defensa del hospedero. El ejemplo evidente de dicho papel es la necesidad del grupo hemo (hierro) para la producción del ácido hipocloroso por la enzima mieloperoxidasa dependiente de hierro. El ácido hipocloroso actúa como factor microbicida (Failla, 2003).

El estado de los elementos traza afecta también la síntesis y la secreción de citocinas y quimiocinas que modulan las actividades de las células inmunes y otras células (Gunter et al., 2003)

En particular, el selenio es esencial para la operación efectiva y eficiente de muchos aspectos del sistema inmune, tanto en animales como en humanos. La inmunidad y el sistema inmune son una colección muy variada de procesos que actúan juntos para proteger a los organismos contra los ataques de los

patógenos y las alteraciones malignas. Muchas de las funciones involucran los mecanismos inflamatorios que, cuando se descontrolan, pueden estar implicados en la patogénesis de condiciones tales como las enfermedades coronarias, el cáncer y la artritis reumatoide inmune. La bioquímica celular del selenio es también un sistema complejo que involucra la expresión de algunas proteínas que contienen selenio, muchas de las cuales aún tienen que ser caracterizadas (Arthur et al., 2003).

Generalidades del selenio.

El Se fue descubierto por Berzelius y Gahn en 1817 mientras examinaban el sedimento de una planta industrial de ácido sulfúrico en Gripsholm, Suecia. A pesar de que desde 1842 se obtuvo evidencia de su toxicidad, se considera que el primer registro escrito de envenenamiento por Se en ganado fue reportado por Madison en 1856 (aparentemente por consumo de grano contaminado con selenio). Para colmo, en 1943 se reportó que este elemento era carcinogénico. Todo esto creó una imagen muy dañina del Se, lo cual hace fácil entender que existieran muchos escépticos cuando en 1957 se presentó la primera evidencia de que podía ser un elemento esencial. A pesar de este comienzo incierto, actualmente se reconoce que existen al menos 15 diferentes selenoproteínas o selenoenzimas en mamíferos y más de siete selenoenzimas microbianas (Whanger, 2002).

Aunque fue difícil cambiar la consideración del Se como una toxina o incluso como carcinógeno, ahora se le considera un micronutriente esencial. En 1967 y en 1972 se publicaron y establecieron las relaciones directas entre los niveles

de la dieta y el Se tisular, basándose en estudios de los niveles del Se en los Estados Unidos. Se han trazado áreas de toxicidad de Se alrededor del mundo, y más recientemente de las zonas con deficiencias de Se, siendo significativo que estas últimas son mucho más extensas que las tóxicas (Oldfield, 2003).

La investigación que contempla la importancia nutricional del Se ha cambiado marcadamente en los últimos 75 años. En 1930 se identificó el Se como un agente tóxico causante de una alcalosis en los animales. En 1940 y al principio del 1950 la investigación se dirigió a la identificación de compuestos de Se específicos que causaban toxicidad y a desarrollar esquemas profilácticos específicos de tratamiento contra la toxicidad del Se. Sin embargo, después de que Schwarz y Folz, reportaron en 1957 que el Se era un nutriente esencial para los animales de laboratorio la investigación sobre el Se cambió radicalmente y se enfocó rápidamente en los animales domésticos y sus deficiencias fueron identificadas como causa de la enfermedad del músculo blanco (Weiss, 2003).

El Se es un oligonutriente esencial en la dieta de los vertebrados superiores, incluyendo los humanos y otros mamíferos. Numerosos beneficios a la salud se le han atribuido a este elemento. Por ejemplo, las evidencias sugieren que el Se tiene propiedades quimiopreventivas del cáncer, inhibe la expresión viral y retrasa el progreso del SIDA en pacientes que son positivos al virus de la inmunodeficiencia humana. Más aún, reduce el riesgo de enfermedades cardíacas y cardiovasculares y desórdenes musculares, detiene el proceso de envejecimiento y tiene participación en el desarrollo de los mamíferos, la

reproducción de los machos y en la función inmune (Martin-Romero et al., 2001; Carlson et al., 2004).

Existe una clase selecta de selenoproteínas que incorporan al selenio como selenocisteína (Gromer et al., 2003). Las selenoproteínas son ciertamente las principales responsables de los beneficios del Se a la salud, habiéndose reportado (Martin-Romero et al., 2001), que los humanos codifican 25 selenoproteínas en su genoma y los ratones 24. A la fecha, se conocen al menos 30 selenoproteínas, muchas de las cuales tienen funciones claramente definidas y se ha señalado que una deficiencia en el Se dietético da como resultado disminución en los niveles de selenoproteínas, lo cual compromete los procesos biológicos en los que se involucran estas proteínas (Beckett y Arthur, 2005).

Por ser el Se un elemento traza esencial para los humanos y muchas otras formas de vida, una deficiencia de este elemento induce algunas condiciones patológicas como el cáncer, enfermedades de corazón y coronarias, y necrosis hepática. La deficiencia de selenio se acompaña también de una pérdida de la inmunocompetencia, y de alteración tanto en la inmunidad mediada por células como en la función de las células B, por lo tanto, la suplementación con Se tiene marcados efectos inmunoestimulantes, incluyendo una mejoría en la proliferación de células T activadas (Saito et al., 2003).

Papel Biológico del selenio

El Se es capaz de ejercer múltiples acciones biológicas por la modificación de la expresión de al menos 30 selenoproteínas, muchas de las cuales tienen funciones claramente definidas (cuadro 4). Familias bien caracterizadas de selenoenzimas son las familias de las glutatión peroxidasas (GPXs), las tioredoxin-reductasas y las iodotironin-desiodinasas, capaces de modificar la función celular actuando como antioxidantes y modificando el estatus redox y el metabolismo de la hormona tiroidea. El Se también se involucra en el crecimiento celular, la apoptosis y la modificación de los sistemas de señalización celular y factores de transcripción (Beckett y Arthur, 2005).

Además de formar parte de varias enzimas tales como la glutatión peroxidasa y la tioredoxin-reductasa, el Se también es parte de la selenoproteína P y otras selenoproteínas (cuadro 4), las cuales contienen selenio en forma de selenocisteína (Sato et al., 1999; Savaskan et al., 2003). La incorporación del Se se realiza co-translacionalmente como un residuo de selenocisteína que es totalmente ionizado al pH fisiológico y actúa como un catalizador redox muy eficiente (figura 6). De las más de 30 selenoproteínas que se han caracterizado o identificado, seis son GPXs, tres son iodotironin-desiodinasas y tres son tioredoxin-reductasas. La selenoproteína P es la principal selenoproteína en plasma y tiene papeles tanto antioxidantes como de transporte. Es así que el Se puede influir en tres distintas áreas de la bioquímica celular, que son: función antioxidante, equilibrio redox y metabolismo de la hormona tiroidea (Beckett y Arthur, 2005).

Cuadro 4: Selenoproteínas de mamífero y sus funciones.

Selenoproteína	Función propuesta
Glutación peroxidasas (GPS)	
GPX1	antioxidante en el citoplasma celular: ¿Almacén de selenio?
GPX2	antioxidante en el tracto gastrointestinal
GPX3	antioxidante en el espacio extracelular y en plasma
GPX4	antioxidante de la membrana y proteínas estructurales del plasma. ¿Apoptosis?
GPX5	Actividad desconocida
GPX6	¿Homóloga de la GPX1?
Tioredoxin-reductasas (TRs)	
	Múltiples papeles, incluyendo el de óxido-reductasa del disulfuro de dithiol. Detoxifica los peróxidos, reduce la tioredoxina (control del crecimiento celular). Mantiene el estado redox de factores de transcripción.
TR1	Ubicación principalmente citosólica
TR2	Expresada en los testículos
TR3	Ubicación mitocondrial
Iodotironin desiodinasas	
	Convierte la tiroxina (T4) en tri-iodotironina bioactiva (T3)
Tipo D1 y D2	Convierte la tiroxina (T4) en T3 reversa
Selenoproteína P	
	Proteína transportadora de selenio. Antioxidante sobre los endotelios
Selenoproteína W	
	¿Antioxidante en el músculo cardiaco y esquelético?
Selenofosfato sintetasa (SPS2)	
	Síntesis de selenofosfato para la síntesis de selenoproteínas
Selenoproteínas de 15 kDa	
	Protección contra el cáncer
H, I, K, M, N, O, R, S, T, V	Papel todavía desconocido

Fuente: (Beckett y Arthur, 2005).

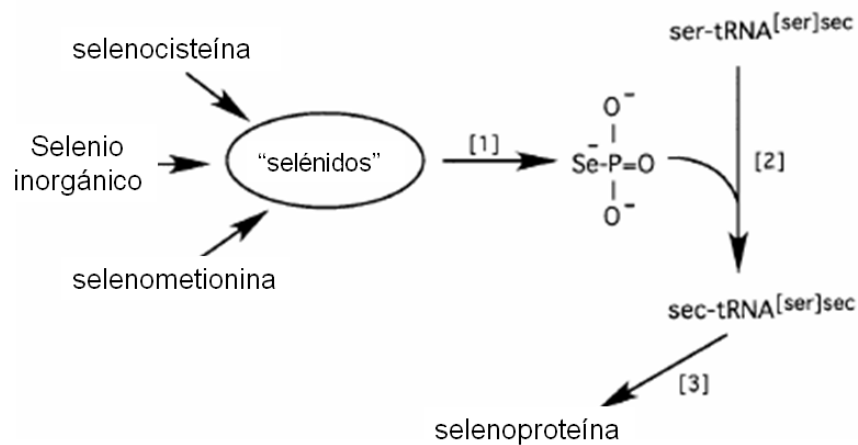


Figura 6. Incorporación del selenio en las selenoproteínas. Las formas dietética y tisular del selenio son convertidas a selénido. Esta o una forma cercana sirven como sustrato para la sintetasa del selenofosfato (1) cuyo producto es el mono-selenofosfato. Este producto se utiliza para transformar la serina unida al $\text{RNA}^{\text{t}^{[\text{ser}]\text{sec}}}$ (2) en selenocisteína. La selenocisteín- $\text{RNA}^{\text{t}^{[\text{ser}]\text{sec}}}$ se inserta en la cadena polipeptídica creciente de la selenoproteína por un complejo que se ha denominado selenosoma (Behne y Kyriakopoulos, 2001).

Como parte integral de la enzima glutatión peroxidasa el Se previene el daño oxidativo a todos los tejidos del organismo. Las deficiencias de Se también pueden inhibir la respuesta de la inmunoglobulina G (IgG) en los retos *in vivo* con eritrocitos de borrego y la detoxificación de ciertos compuestos xenobióticos (Gunter et al., 2003). Existen 4 isoenzimas de GPX que están involucradas en la degradación del peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos.

Se ha sugerido que los efectos antioxidantes del Se son mediados a través de la GPX que elimina potencialmente el daño de los hidroperóxidos lipídicos y el peróxido de hidrógeno. Por lo menos 5 de esas peroxidasa han sido ahora identificadas como operadoras en diferentes componentes de las células y los tejidos. Así, el Se puede actuar como un antioxidante en el espacio extracelular y el citosol celular, en asociación con las membranas celulares y

específicamente en el tracto gastrointestinal, todo esto con potencial para influir en los procesos inmunes. Adicionalmente, la tioredoxin reductasa que contiene Se puede también actuar como antioxidante (Arthur et al., 2003).

Como una parte integral de la enzima GPX, el Se funciona para la prevención del daño oxidativo a los tejidos corporales (Gunter et al., 2003), pues como un constituyente esencial de GPX, juega un papel importante en recolectar desechos de ROS (Kim y Mahan, 2001). Así, el Se es una parte vital en muchas funciones metabólicas como componente clave de la GPX, la cual está involucrada en la remoción de peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos generados en las células durante el proceso oxidativo (Cases et al., 2001).

Biodisponibilidad del Selenio

La mayoría de las formas de Se que se encuentran en los comestibles son las orgánicas, las formas asociadas a proteínas, la selenometionina (SeMet de fuentes de plantas y animales) y la selenocisteína (SeCis de fuentes animales). El selenato está también presente en algunos comestibles, y en áreas selenodeficientes las sales de Se inorgánicas (selenito y selenato) son adicionadas a los alimentos (Cases et al., 2001). La mayor parte del selenio en los tejidos y fluidos del organismo está presente ya sea como SeCis, que funciona como centro activo de selenoproteínas, o como SeMet, que se incorpora a otras proteínas que actúan como depósito biológico de selenio (Juniper et al., 2006).

Dado que el selenio es de gran importancia en la nutrición del ganado, la calidad nutricional de la alimentación se puede mejorar mediante la

suplementación de este mineral. En la Unión Europea, sólo las fuentes de selenio inorgánico como el selenato y el selenito de sodio están aprobadas como aditivos alimentarios, con una dosis máxima legal de 0.5 mg de selenio/kg de materia seca. Este valor es más alto que el límite de 0.3 mg de selenio/kg de materia seca establecido por las regulaciones de la FDA de los Estados Unidos, dónde ambas fuentes de selenio, tanto la orgánica como la inorgánica están aprobadas (Juniper et al., 2006).

Estudios recientes han demostrado que la absorción de selenio ocurre en el intestino delgado y que a pesar de que la selenometionina se absorbe vía el sistema de transporte de metionina, la absorción del selenito de sodio es menos eficiente y ocurre principalmente por difusión pasiva (Juniper et al., 2006). En animales rumiantes, la asociación de minerales con fracciones de fibra en los alimentos y/o minerales ligados a los constituyentes de la fibra no digerible en el tracto gastrointestinal, puede alterar la biodisponibilidad de algunos minerales traza en los rumiantes. El pH en el medio ambiente del rumen es sólo ligeramente ácido (6.0 - 6.8), y muchos minerales traza existen en forma insoluble, por lo que algunos de los complejos metálicos que son formados en el rumen permanecen insolubles aún bajo las condiciones ácidas del abomaso (Spears, 2003).

El Se está ampliamente distribuido en el ambiente (agua, suelos y aire), donde se encuentra en muy bajas concentraciones ($\leq 1\mu\text{g/g}$). Desde los años 50's del siglo pasado, ya se sabía que el Se es uno de los elementos indispensables para el crecimiento y el funcionamiento normal de plantas y animales, y que su

deficiencia provoca distrofia muscular y cirrosis hepática. En muchas granjas de varios países el selenito de sodio se emplea con fines profilácticos y terapéuticos en dosis cercanas a los niveles tóxicos. Los niveles del requerimiento nutricional de selenio se estiman en el rango de 0.1 - 0.3 mg/kg, mientras que los niveles entre 2 y 10 mg/kg pueden ocasionar síntomas de toxicidad crónica (Bem, 1981)

Los suelos de pastura de muchas de las regiones lecheras importantes del mundo son deficientes en Se y los alimentos que crecen en estos suelos proporcionan una dieta inadecuada en él, por lo cual la deficiencia de Se en el ganado alimentado con pastura y con forraje está altamente distribuida tanto en Estados Unidos como en el resto del mundo. (Bhaskaram, 2001; Kulberg et al., 2002; Gunter et al., 2003).

La actividad de las selenoproteínas depende de un adecuado suministro en la dieta, y debido a que el Se es incorporado en la dieta a través de las plantas, esta disponibilidad puede variar con las condiciones climáticas y de fertilización del suelo (Cases et al., 2001). Por otra parte, la eficiencia de absorción de muchos minerales traza y factores dietéticos que afectan la biodisponibilidad de los minerales difiere grandemente entre rumiantes y no rumiantes. En los primeros, la digestión microbiana en el rumen y el retículo preceden a la digestión en el abomaso e intestino delgado. Las dietas de los rumiantes son usualmente altas en fibra, y la digestión considerable de fibra ocurre vía la fermentación microbiana en el rumen. La biodisponibilidad del Se es reducida por el alto contenido de azufre dietético y la presencia de glicósidos

carcinogénicos en ciertas legumbres (Spears, 2003). Es muy importante conocer la biodisponibilidad de Se presente en la dieta para establecer su estado nutricional en relación a la ingesta dietética y para intervenir rápidamente en casos de deficiencia (Cases et al., 2001).

Selenio orgánico contra Selenio inorgánico

Los beneficios conferidos por el Se a la salud animal y a la productividad, han estimulado los esfuerzos por investigar la forma mas efectiva en que se puede aplicar. Gran parte de la atención se ha enfocado en la comparación de las fuentes de Se orgánico contra las de Se inorgánico; la forma orgánica es con frecuencia proveniente de la levadura selenizada y las formas inorgánicas son las sales de sodio. Aparentemente, las diferentes formas de selenio se comportan de manera diferente cuando se varían los niveles en la dieta. Cuando la fuente de alimentación es el Se orgánico, éste se retiene más en los tejidos corporales, lo cual reduce el Se disponible que pudiera precipitar una respuesta selenótica. Sin embargo, debe preverse, que una vez que el tejido aminora su crecimiento y el catabolismo tisular disminuye, un nivel dietético superior, en combinación con reservas de Se tisular aumentadas, puede contribuir a que las reservas de Se puedan exacerbar la condición selenótica (Kim y Mahan, 2001).

En 1979, después de años de investigación, se demostraron muchos efectos benéficos de la suplementación con Se en los animales domésticos, La “US Food and Drug Administration” (US-FDA) publicó la regulación que legalizó la suplementación con Se en las dietas de las vacas lecheras (Weiss, 2003).

Actualmente, en la Unión Europea, sólo las fuentes de selenio inorgánico como selenato y selenito de sodio están aprobadas como aditivos alimentarios, con una dosis máxima legal de 0.5 mg de selenio/kg de materia seca. Este valor es más alto que el límite de 0.3 mg de selenio/kg de materia seca establecido por las regulaciones de la FDA de los Estados Unidos, dónde ambas fuentes de selenio, tanto la orgánica como la inorgánica están aprobados (Juniper et al., 2006).

Ortman y Pehrson (1999) encontraron que a niveles fisiológicos semejantes de suplementación con Se, el Se orgánico fue más efectivo para aumentar la concentración de Se en sangre total, en plasma y posiblemente para aumentar la actividad de GSH-Px en los eritrocitos. Y a su vez, que las vacas lecheras suplementadas con un producto de levadura (selenio orgánico) obtenían concentraciones de Se en leche superiores a aquellas que se habían suplementado con selenito de sodio (Pehrson et al., 1999).

En comparación con los monogástricos, los rumiantes absorben pobremente el selenito de sodio, pero en investigaciones recientes con Se orgánico proveniente de la levadura de Se, se ha demostrado que las vacas suplementadas con levadura de Se transfieren el Se a sus becerros de manera mas eficiente, por vía placentaria y por medio de la leche, que aquellas que se suplementan con selenito de sodio (Gunter et al., 2003)

Las formas de Se más frecuentemente consumidas por los rumiantes son la selenometionina (Se Met), la selenocisteína (Se Cys), el selenito y el selenato. Los alimentos basales y la levadura de Se , proveen la mayoría de los

selenoamino ácidos y los suplementos inorgánicos proveen selenito y selenato. Los selenoaminoácidos son idénticos a sus contrapartes (metionina y cisteína) excepto por una molécula de Se que reemplaza a la de azufre. Los datos disponibles sobre el metabolismo de los compuestos de Se en los rumiantes son limitados y esencialmente no se dispone de información sobre los mecanismos de absorción (Weiss, 2003).

La primera evidencia directa de que las deficiencias de vitamina E y selenio se relacionan con la salud de la glándula mamaria se reportó hace 20 años. Desde aquel reporte inicial, el papel de la vitamina E y el del Se en las defensas del hospedante contra la mastitis se ha venido investigando, empleando una variedad de modelos y diseños experimentales. Los primeros intentos se concentraron en que las deficiencias dietéticas de vitamina E y Se daban como resultado un aumento en la incidencia natural de mastitis clínicas, pero subsecuentemente los estudios de campo en todo el mundo confirmaron la importancia práctica de la suplementación dietética de vitamina E y Se de las vacas lecheras para mantener la salud de la ubre (Hogan et al., 1993).

Determinación del estado de la función de los neutrófilos

El estado de la función microbicida oxígeno-dependiente de los neutrófilos puede ser evaluado mediante una prueba que detecte la función del estallido respiratorio de los mismos, o sea la producción de radicales oxígeno- reactivos, tal como el método de reducción del Nitroazul de Tetrazolio (NBT).

Se atribuye a Park *et al.* (Park et al., 1968), la primicia en utilizar la prueba de reducción del NBT en neutrófilos, como ayuda en el 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 al microscopio para determinar el porcentaje de neutrófilos que presentan depósitos intracitoplásmicos de formazán. Este porcentaje generalmente aumenta en infecciones bacterianas debido a la función fagocítica de los neutrófilos.

El NBT, es un compuesto de tetrazolio aromático nitro-sustituido amarillo soluble en agua, que reacciona con los iones súper-óxido celulares para formar un derivado del formazán, que puede ser monitoreado espectrofotométricamente. El NADPH citoplásmico que se produce al oxidar la glucosa a través de la vía de la hexosa monofosfato, sirve como un donador de electrones. El sistema oxidasa disponible en el citoplasma, ayuda a transferir los electrones desde el NADPH hasta el NBT, reduciéndolo a formazán. Por tanto, la reacción del NBT refleja indirectamente la actividad de generación de radicales libres oxígeno dependientes en el citoplasma de las células (Esfandiari et al., 2003).

El grado de reducción del NBT depende básicamente de la generación de donadores de electrones, como los aniones super-óxido en los fago-lisosomas. La deficiencia para reducir el NBT indica un bloqueo de los procesos metabólicos oxidativos e incapacidad del fagocito para efectuar daño oxidativo a los microorganismos ingeridos, por tanto, la reducción del NBT, se puede

considerar como una medida indirecta de las actividades microbicidas oxígeno-dependientes de los neutrófilos (Silva et al., 1989)

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, incluyendo la estimulación *in vitro* del sistema fagocítico. Esta estimulación puede alcanzarse mediante la incorporación de filtrado de cultivo bacteriano, partículas de latex, cimosán o endotoxina, contacto con vidrio o con altas concentraciones de heparina en la mezcla de incubación de sangre- NBT (Segal, 1974). De tal forma que al estimular a los neutrófilos con un agente externo, se evalúa tanto su capacidad fagocítica como la función microbicida oxígeno-dependiente.

Métodos para la determinación de selenio

Una gran variedad de métodos de análisis pueden ser aplicados para la determinación de trazas de Se a partir de diversos materiales, incluyendo principalmente: Análisis de activación nuclear; espectroscopía de absorción atómica; cromatografía de gases; espectrofotometría; análisis de fluorescencia de rayos-x y otros, entre ellos la fluorimetría y la potenciometría (Bem, 1981), siendo las más recomendadas para determinar cantidades en nano y microgramos en muestras biológicas la espectrometría de absorción atómica, la fluorimetría y la absorción atómica nuclear (Tsalev, 1995)

Los productos de reacción del Se (IV) con el 3' 3' diaminobenceno (DAB) y el 2,3 diaminonaftaleno (DAN) muestran una fuerte fluorescencia que se ha utilizado para la determinación fluorimétrica del metal en muchos materiales. El método fluorimétrico es, sin embargo, muy sensible a la interferencia de otros compuestos coextraídos. A pesar de eso, en el año de 1974 fué recomendado por la EPA (Environmental Protection Agency) para la determinación de Se . Este es un método sensible y con posibilidad de estimar el Se en un rango de 0.005 a 100 μg (Bem, 1981).

Waliszewski y Skupin estimaron al Se en rangos de 0.063 a 3 mg/kg (en muestras de 0.5 a 1 g), utilizando extracción con DAB y tolueno. Nazarenko et al. analizaron el Se en alimentos con DAN a una sensibilidad de 0.001 $\mu\text{g/g}$. Brown y Watkinson propusieron un método automático para la estimación de cantidades de Se en nanogramos y lo emplearon para análisis directo en sangre. Este método se basa en la medida de la fluorescencia de 4,5-benzopiazselenol en ciclohexano y permite medir 40 muestras por hora con un límite de detección de 0.44 ng/g (Bem, 1981).

Los ensayos espectroscópicos y fluorimétricos involucran con frecuencia una digestión completa de la materia orgánica y una reducción del analito Se (IV). El estado de oxidación del Se es de vital importancia: sólo el Se (IV) es reducido a H_2Se , y por lo tanto, cualquier selenato [Se (VI)] debe ser reducido cuantitativamente a selenito antes de la determinación. Esta pre-reducción generalmente se hace calentando la solución analizada con HCl (3 a 6M) durante 5 a 30 min a 100°C. Un calentamiento prolongado puede ocasionar

pérdidas parciales del analito en formas volátiles como $\text{SeO} \cdot \text{Cl}_2$, $\text{SeO}_2 \cdot 2\text{HCl}$, etc. Tsalev (1995), menciona que Sinemus *et al.* evitaban las pérdidas calentando las muestras de agua ambiental con HCl 5 M durante 10 min a 80°C en una autoclave cerrada, aunque otros autores prefieren reducir el selenato a selenito con H_2O_2 y subsiguientemente con $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$. Se cree que esta reducción previene las pérdidas por volatilización y es una práctica más exitosa previa a la extracción líquido-líquido del Se (IV) (Tsalev, 1995)

Neutrófilos y Selenio

Los neutrófilos o PMNs son cruciales en la protección del organismo contra los patógenos invasores. Como primer grupo de defensa, migran rápidamente hacia los tejidos, en los cuales fagocitan y matan a los invasores en los sitios de inflamación (Kulberg et al., 2002)

Como parte de la respuesta inflamatoria de la mastitis, los leucocitos son reclutados a partir de la sangre periférica y llevados hacia la glándula mamaria. Sin embargo, la acumulación excesiva de células inflamatorias altera la calidad de la leche y las proteasas producidas por los neutrófilos polimorfonucleares y por los macrófagos pueden ocasionar un daño en el tejido mamario (Prin-Mathieu et al., 2002).

Varios autores (Mallard et al., 1998; Waller, 2000; Monfardini et al., 2002) han observado que la función de los leucocitos polimorfonucleares está alterada durante el periodo del parto. Estos investigadores han especulado que la función atenuada de los neutrófilos contribuye al aumento en la incidencia de la mastitis post-parto. Estudios paralelos y subsecuentes han demostrado que la

incidencia de mastitis clínica es mayor en vacas con baja actividad del estallido respiratorio de los neutrófilos

En 1979, algunos investigadores reportaron que la función de los neutrófilos estaba comprometida en el ganado con deficiencias de Se , sugiriendo que la posibilidad de enfermedades infecciosas tales como la mastitis y la metritis aumentaba. Otros más estudiaron la función de los neutrófilos mamarios en vacas deficientes en Se pero con vitamina E adecuada, encontrando que dichas células tenían una elevada acumulación de peróxido de hidrógeno, viabilidad disminuida y capacidad reducida para matar intracelularmente a los patógenos de la mastitis y que el estado del Se no influía sobre la capacidad de los neutrófilos para fagocitar bacterias (Smith et al., 1997).

Las vacas suplementadas con Se tienen una respuesta mas rápida de células somáticas al reto bacteriológico y mantienen menores niveles de unidades bacterianas formadoras de colonias por mililitro de leche, eliminando más rápido las infecciones intra mamarias (IMI), presentando signos clínicos menos severos que las vacas no suplementadas. Los neutrófilos recolectados de leche de vacas con suplementación alimentaria de Se presentaban un aumento en la muerte intracelular de bacterias, una mayor viabilidad y una reducción en las concentraciones de peróxido de hidrógeno extracelular, en comparación con los neutrófilos provenientes de leche de vacas con dietas deficientes en Se. La muerte intracelular de bacterias también fue mayor en neutrófilos aislados de sangre de vacas suplementadas con Se vía parenteral que en aquellas sin suplementación (Hogan et al., 1993).

En un experimento realizado por Morgante *et al.*(1999), la suplementación parenteral con vitamina E y Se en el período seco de las ovejas, redujo las cuentas de células somáticas (5.4 vs 6.0 log 10) durante la lactación subsecuente. Más aún, la administración de vitamina E y Se se asociaron con diferencias en las cuentas celulares diferenciales de las muestras de leche (macrófagos 48.8% vs 38.4%; neutrófilos polimorfonucleares 40.1% vs 50.7%; y eosinófilos 0.7% vs 1.4% para ovejas control y ovejas que reciben suplementación, respectivamente).

Según la SAGARPA (2005), México ocupa en América Latina el primer lugar en caprinocultura, con nueve millones 500 mil cabezas. La producción de carne en 2004 se estimó en casi 47 mil toneladas, y la producción de leche en 155 millones de litros. Esta actividad productiva ha venido tomando auge en nuestro país, y muestra de ello es que el pronóstico de producción de leche de esta especie en el 2004 se superó en un tres por ciento, siendo los principales estados productores Coahuila, Durango, Guanajuato, Chihuahua y Jalisco.

A pesar de la importancia del selenio en la dieta de los rumiantes y al auge de la ganadería caprina nacional, a la fecha, no se cuenta con estudios que determinen el efecto de la suplementación alimenticia con Se orgánico sobre las funciones de defensa en cabras.

Si el Se tiene un efecto favorable sobre la función de los neutrófilos caprinos como se ha visto en los bovinos, se espera que las cabras suplementadas con Se durante el parto presenten mejor respuesta en cuanto a número y función de neutrófilos en sangre que las no suplementadas, por lo que el

objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación oral con Se orgánico sobre la respuesta inmunológica de tipo inespecífica, en particular la mediada por los neutrófilos, para lo cual se comparó el número de leucocitos, el número de neutrófilos, la actividad fagocítica y la actividad metabólica de los neutrófilos sanguíneos de cabras suplementadas con Se orgánico oral durante el período de periparto con los de cabras no suplementadas, haciendo también una relación con los niveles de Se en sangre.

MATERIALES Y METODOS

Animales

El experimento se realizó de diciembre del 2005 a enero del 2006, en el Centro Caprino del Departamento 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, bloqueados en base a peso, 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 (1999)], por vía oral directamente con un aplicador y el grupo control (GC, n=5) el cual sólo recibió 10 ml de solución glucosada al 25% por la misma vía y de igual manera.

Muestras

Se tomaron muestras de sangre (5 ml) por punción yugular al inicio de la suplementación (muestra basal), 15 días antes de la fecha calculada para el parto, en las 24 h posteriores al parto, y a los 15 y 30 días después del mismo. Las muestras de sangre para evaluar leucocitos fueron colectadas en tubos Vacutainer® con EDTA, recuperándose también de cada animal experimental, sangre heparinizada en viales siliconizados (Sigma Chemical Co., St. Louis MO.

Cat. 840-20) para realizar la prueba de reducción del NBT con estimulación de los neutrófilos (Kit de procedimientos Sigma Chemical Co. Cat. 840).

A la par, se almacenaron a -20°C , alícuotas de las muestras desangre con EDTA en tubos eppendorf para posteriormente llevar a cabo la determinación de los niveles de selenio por fluorimetría.

Cuentas totales y diferenciales de leucocitos en sangre

Para realizar la cuenta total de leucocitos se empleó la sangre total con EDTA, tomando 5 ml con una pipeta de Thoma y diluyéndola en proporción 1:20 con una solución al 1% de ácido acético (1:20, vol/vol) y se contó el número de leucocitos en una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico simple marca Zeiss con lente 40X, mientras que las cuentas diferenciales de leucocitos se determinaron sobre laminillas de sangre teñidas con hemocolorante Rápido (Hycel, Cat. 548), contando en el microscopio con objetivo 100X y aceite de inmersión 100 leucocitos, para conocer el porcentaje de neutrófilos, de linfocitos y de monocitos (Seiverd, 1977).

Prueba de Reducción del NBT

La prueba de reducción del NBT se realizó según lo descrito por Park *et al* (1968) dentro de las 2 h siguientes a la colección de la muestra de sangre. Se empleó el Kit de procedimientos número 840 de Sigma Chemical Co. para la determinación microscópica de neutrófilos sanguíneos que contienen depósitos intracitoplásmicos de formazán. La prueba de reducción del NBT se realizó estimulando simultáneamente a los neutrófilos con el antígeno bacteriano

líoofilizado que se incluye en el equipo, ya que de esta manera, se prueba tanto la capacidad fagocítica como la función oxidativa de los neutrófilos (SIGMA-ALDRICH, s/f). Las laminillas teñidas se observaron empleando objetivo de inmersión (100x) contando 100 neutrófilos. Los neutrófilos sanguíneos que mostraron gránulos de depósito de formazán se registraron como células reductoras.

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 (Cristaldi et al., 2005). Se utilizó la técnica de fluorimetría, previa digestión ácida de las muestras, según lo sugerido por Sheehan *et al.*(1990) y 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 tetrahidrocloreuro 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 $\mu\text{g/l}$ que se almacenaron a temperatura ambiente.

Análisis estadístico de los resultados

Los datos fueron analizados con ANOVA, por medio del programa estadístico SAS (SAS®, 1996) usando el procedimiento de modelo lineal generalizado (GLM por sus siglas en inglés) para medidas repetidas, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \text{TRT}_i + \text{TIEMPO}_j + \text{TIEMPO} \times \text{TRT}_{ij} + e_{ijk}$$

donde: Y_{ij} = variable dependiente, μ = media, TRT_i = efecto de la suplementación, TIEMPO_j = efecto de la fecha de muestreo, $\text{TIEMPO} \times \text{TRT}_{ij}$ = 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 5 se reflejan los resultados de los parámetros hematológicos, el porcentaje de neutrófilos reductores de NBT 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. Se encontró diferencia ($P < 0.01$) en el porcentaje de neutrófilos sanguíneos reductores de NBT entre las cabras de ambos grupos experimentales (9.3 GS vs 6.8 GC). También se observó un aumento significativo ($P < 0.01$) en los valores de leucocitos totales de las cabras del grupo control (GC 9.5 vs GS 8.2); por el contrario, 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 5: Medias de mínimos cuadrados y desviación estándar del error (DE) 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)	DE	NS [†]
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9.5	8.2	0.32	0.01
PMNs (%)	31.8	29.5	1.03	0.13
Linfocitos (%)	59.9	64.3	1.13	0.01
NBTR (%)	6.8	9.3	0.47	0.01
Selenio (ppm)	0.69	0.71	0.10	0.85

[†] Nivel de significancia

De acuerdo con los períodos de muestreo, se encontraron diferencias ($P < 0.01$) en el porcentaje de neutrófilos reductores de NBT (Fig. 7) en la fecha 15 d, siendo mayor el porcentaje del grupo suplementado que el del grupo control

(13.8 vs 7.0 respectivamente). El porcentaje de neutrófilos en sangre (Fig. 8) no arrojó diferencia entre los grupos en ninguna de las fechas de muestreo sin embargo, se observa una elevación ($P < 0.01$) en el d 15 con respecto al 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.

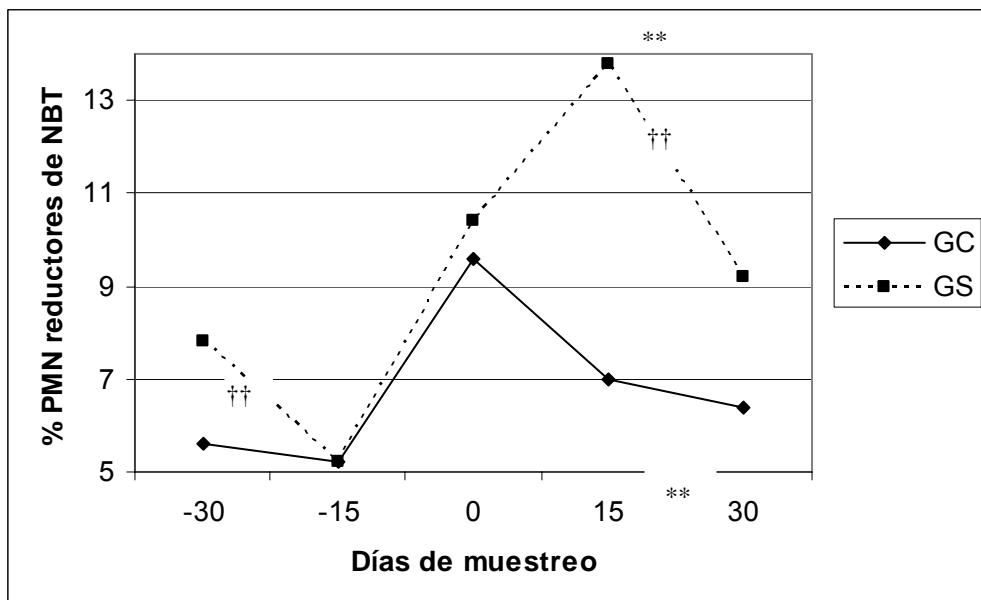


Figura 7. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio ($3 \text{ mg}^{-\text{d}}$) sobre el porcentaje de neutrófilos sanguíneos reductores de NBT en cabras en periparto (GC = Grupo Control; GS = Grupo Suplementado; ** = $P < 0.01$ entre tratamientos, †† = $P < 0.01$ entre días de muestreo).

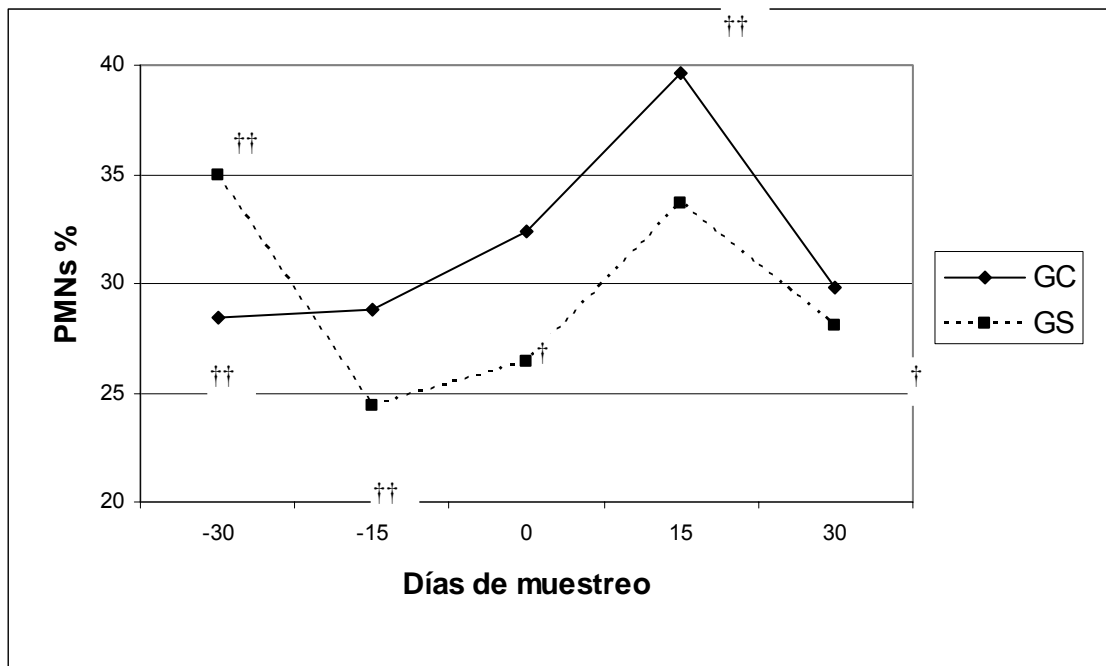


Figura 8. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio ($3 \text{ mg}^{-\text{d}}$) sobre el porcentaje de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en cabras en periparto (GC = Grupo Control; GS = Grupo Suplementado; † = $P < 0.05$ entre días de muestreo, †† = $P < 0.01$ entre días de muestreo).

Los linfocitos (Fig. 9) mostraron en 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 una 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. Por otra parte, el total de leucocitos (Fig. 10) fue similar ($P > 0.05$) tanto entre ambos grupos como entre tiempos de muestreo. Finalmente, al igual que en el total de leucocitos, los niveles sanguíneos de selenio no mostraron cambios significativos ($P > 0.05$) ni entre grupos experimentales, ni entre tiempos de muestreo (Fig. 11).

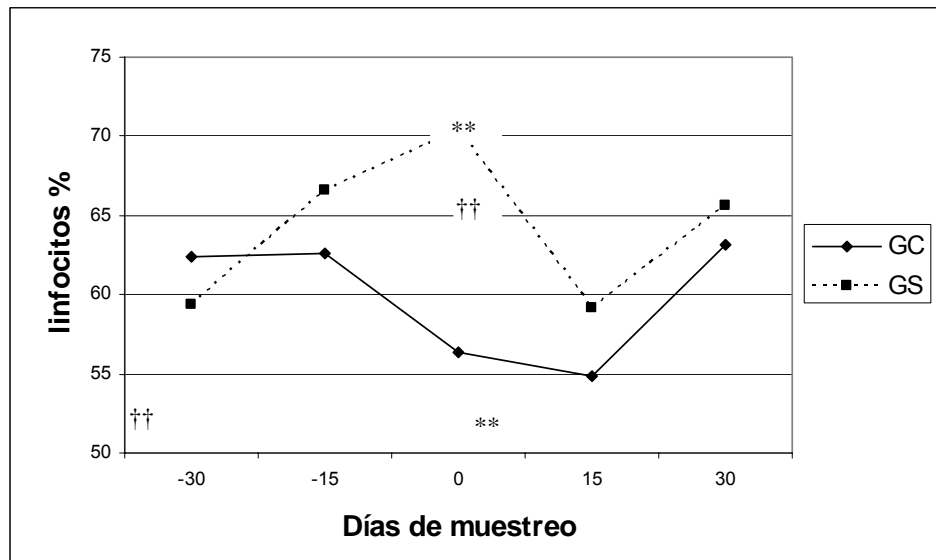


Figura 9. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio ($3 \text{ mg}^{-\text{d}}$) sobre el porcentaje de linfocitos sanguíneos en cabras en periparto (GC = Grupo Control; GS = Grupo Suplementado; ** = $P < 0.01$ entre tratamientos, †† = $P < 0.01$ entre días de muestreo).

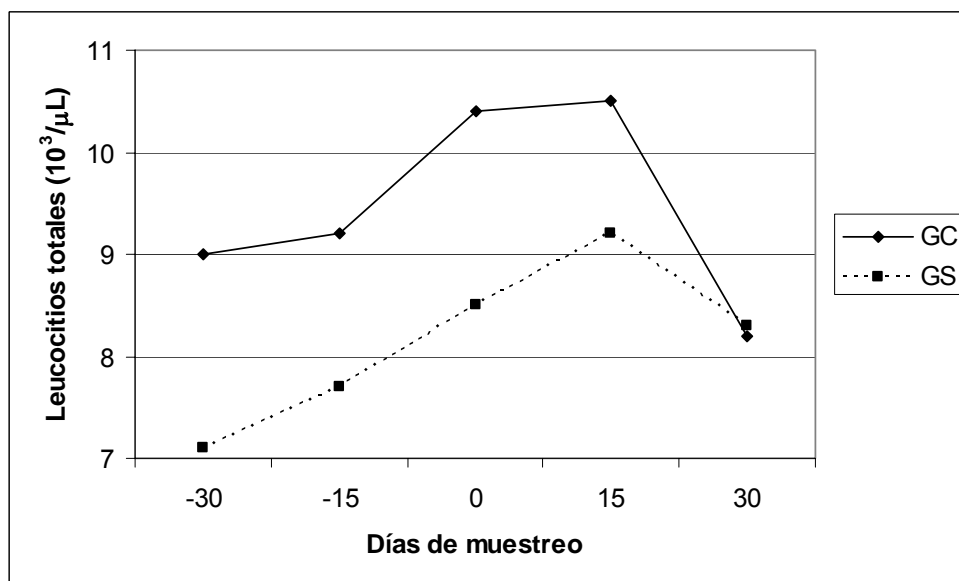


Figura 10. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio ($3 \text{ mg}^{-\text{d}}$) sobre el número total de leucocitos sanguíneos en cabras en periparto (GC = Grupo Control; GS = Grupo Suplementado).

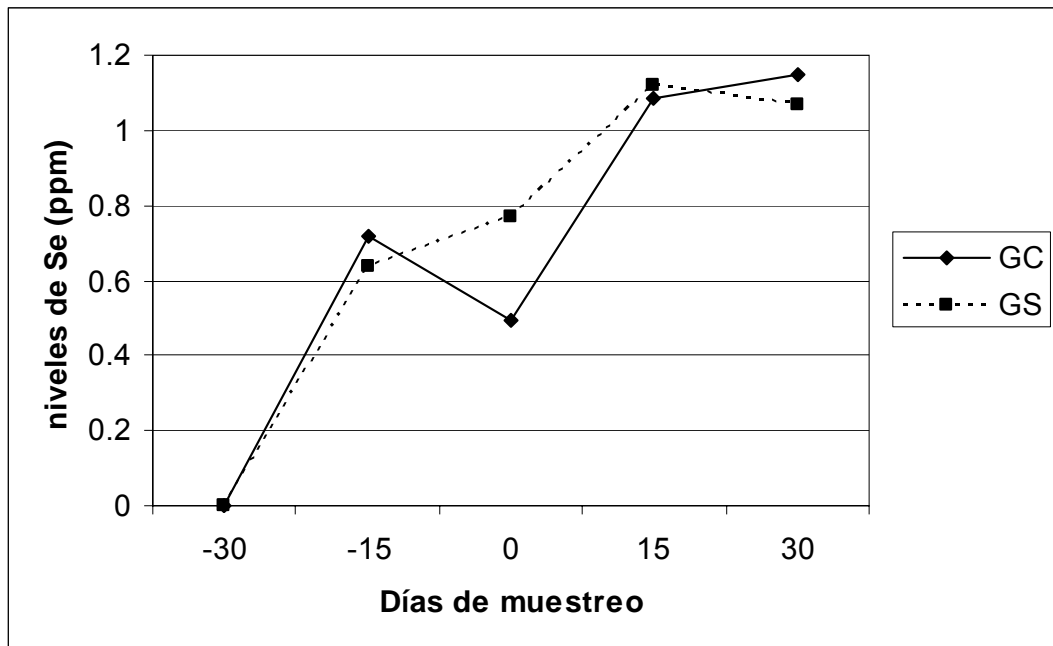


Figura 11. Efecto de la suplementación oral con levadura de Selenio (3 mg^{d}) sobre los niveles sanguíneos de Selenio en cabras en periparto (GC = Grupo Control; GS = Grupo Suplementado).

DISCUSIÓN

El estallido respiratorio en los neutrófilos se caracteriza por marcados cambios en el metabolismo oxidativo que ocasionan un incremento en la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno (Segal, 2005). Sin embargo, a pesar de que los metabolitos de oxígeno generados por los neutrófilos son necesarios para los mecanismos de defensa antimicrobianos, estos radicales libres pueden también causar daño a los neutrófilos y a los tejidos que los rodean (Hogan et al., 1990; Morgante et al., 1999), esto ha sido comprobado en vacas deficientes en selenio, cuyos PMNs presentan una elevada acumulación de peróxido de hidrógeno, viabilidad disminuída y capacidad reducida para matar intracelularmente a los patógenos mamarios (Smith et al., 1997; Meglia et al., 2001).

El selenio, forma parte de la enzima GSHPx 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 (Hogan et al., 1990) y en ovejas (Morgante et al., 1999). En el presente experimento se midió la actividad microbicida de los neutrófilos por medio de la prueba de reducción del NBT. El grado de reducción del NBT depende primariamente de la generación de donadores de electrones como los aniones superóxido en los fagolisosomas, por lo tanto, la reducción del NBT se puede considerar como una medida indirecta de las actividades microbicidas oxígeno-dependientes de los neutrófilos (Silva et al., 1989).

Los resultados mostraron que los PMNs del grupo de cabras suplementadas con levadura de selenio tuvieron una mayor actividad microbicida ($P < 0.05$), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Morgante *et al*, (1999) para ovejas y por Hogan *et al*, (1990) para vacas y confirma que también en cabras la suplementación con selenio mejora la actividad microbicida de los neutrófilos. Además, es importante mencionar que el mayor grado de actividad de los PMNs se encontró en el d15, lo cual indica que es en ese momento cuando los animales están más protegidos contra las infecciones, siendo ésto favorable, pues es en esta etapa de la lactación cuando suponemos puede haber una mayor susceptibilidad a las infecciones por patógenos intramamarios.

A pesar de que la función de los neutrófilos mostró diferencia entre los grupos experimentales, esto no se puede correlacionar con el porcentaje de PMNs ni con los niveles de selenio en sangre, ya que ninguno de estos parámetros mostró cambio ($P > 0.05$), ni por efecto de la suplementación ni del tiempo. 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 (Knowles *et al*., 1999; Ortman y Pehrson, 1999; Pehrson *et al*., 1999; Weiss y Hogan, 2005; Juniper *et al*., 2006) que han analizado los efectos de la suplementación oral con selenio orgánico en vacas, reportan 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 éste 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 concentración de 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 (3mg^{d}) se haya dado una saturación que no permitió apreciar una elevación de selenio en sangre, a pesar de que su efecto en los PMNs si fue detectado. 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.

Entre los grupos experimentales, las cuentas totales de leucocitos sanguíneos no mostraron variación en ninguno de los tiempos de muestreo. La diferencia en el número de leucocitos que se aprecia como un efecto del tratamiento, en verdad podría deberse a que los animales del grupo control manifestaron desde el principio cuentas más altas de leucocitos en comparación con el grupo suplementado. En este experimento no se encontró el patrón del comportamiento de los leucocitos mencionado por Waller (2000) para los leucocitos de vacas, es decir, un aumento al momento del parto y la recuperación de los niveles normales unas semanas después (30 días después

del parto). Los PMNs en la sangre de las cabras del grupo control aumentaron en el d15 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 (2000) y Kulberg (2002) para el comportamiento de estas células en el periparto, mientras que los PMNs del grupo suplementado no manifestaron ninguna elevación. Es probable que el buen nivel funcional de los PMNs ejerza un control sobre la salida excesiva de neutrófilos provenientes de la médula ósea, lo cual controla la elevación de éstos en sangre.

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, Kiremidjian-Scumacher *et al.* (1994) observaron que la suplementación con selenio en humanos favorece la proliferación de linfocitos T. Resulta interesante que en el presente experimento, el pico de este aumento se encontró al momento del parto (Fig 9), pues podría estar relacionado con un efecto estimulante 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 es el común cuando se suplementa levadura de selenio a cabras durante el periparto. En conclusión, podemos mencionar que los resultados obtenidos aportan evidencias acerca del efecto favorable de la suplementación con selenio orgánico sobre la respuesta inmune en cabras durante el periparto, tanto en la respuesta inespecífica (función de los neutrófilos sanguíneos), como en la específica (número de linfocitos).

LITERATURA CITADA

- Aarestrup, F. M. y N. E. Jensen (1997). "Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period." J Dairy Sci **80**(2): 307-12.
- Aguilar, B., B. Amorena y M. Iturralde (2001). "Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis." Veterinary Microbiology **78**: 183-191.
- Aguilar, B. y M. Iturralde (2001). "Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells." Veterinary Microbiology **82**: 165-175.
- Akineden, O., C. Annemuller, A. A. Hassan, C. Lammler, W. Wolter y M. Zschock (2001). "Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis." Clin Diagn Lab Immunol **8**(5): 959-64.
- Arthur, J. R., R. C. McKenzie y G. F. Beckett (2003). "Selenium and the Immune System." J Nutr **133**(suppl): 1457S-1459S.
- Beckett, G. J. y J. R. Arthur (2005). "Selenium and endocrine systems." J Endocrinol **184**(3): 455-65.
- Behne, D. y A. Kyriakopoulos (2001). "Mammalian selenium-containing proteins." Annu Rev Nutr **21**: 453-73.
- Bem, E. W. (1981). "Determination of Selenium in the Environment and in Biological Material." Environ. Health Persp. **37**: 183-200.
- Berriatua, E., I. Ziluaga, C. Miguel-Virto, P. Uribarren, R. Juste, S. Laevens, P. Vandamme y J. R. Govan (2001). "Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection." J Clin Microbiol **39**(3): 990-4.
- Bhaskaram, P. (2001). "Immunobiology of mild micronutrient deficiencies." Br J Nutr **85 Suppl 2**: S75-80.
- Bhaskaram, P. (2002). "Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: an overview." Nutr Rev **60**(5 Pt 2): S40-5.
- Boddie, R. L. y S. C. Nickerson (1997). "Evaluation of two iodophor teat germicides: activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*." J Dairy Sci **80**(8): 1846-50.
- Boddie, R. L., S. C. Nickerson y R. W. Adkinson (1997). "Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*." J Dairy Sci **80**(11): 2809-14.
- Bouchard, L., S. Blais, C. Desroisiers, X. Zhao y P. Lacasse (1999a). "Nitric Oxide Production During Endotoxin-Induced Mastitis in the Cow." J Dairy Sci **82**: 2574-2581.
- Bouchard, L., S. Blais, C. Desroisiers, X. Zhao y P. Lacasse (1999b). "Nitric Oxide Production During Endotoxin-Induced Mastitis in the Cow." J Dairy Sci **82**: 2574-2581.
- Boutinaud, M., H. Rulquin, D. H. Keisler, J. Djiane y H. Jammes (2002). "Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland." J Anim Sci **80**(5): 1258-69.

- Bradley, A. J. y M. J. Green (2001). "Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland." J Clin Microbiol **39**(5): 1845-9.
- 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.
- Burton, J. L., S. A. Madsen, J. Yao, S. S. Sipkovsky y P. M. Coussens (2001). "An immunogenomics approach to understanding periparturient immunosuppression and mastitis susceptibility in dairy cows." Acta Vet Scand **42**(3): 407-24.
- Butler, J. A., S. A. Sickles, C. J. Johanns y R. F. Rosenbusch (2000). "Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feed calves: thermal effects on various mycoplasma." J Dairy Sci **83**(10): 2285-8.
- Carlson, B. A., S. V. Novoselov, E. Kumaraswamy, B. J. Lee, M. R. Anver, V. N. Gladyshev y D. L. Hatfield (2004). "Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function." J Biol Chem **279**(9): 8011-7.
- Casadevall, A. y L. A. Pirofski (2000). "Host pathogen interactions: basic concepts of microbial comensalism, colonization, infection and disease." Infect Immun **68**(12): 6511-8.
- Cases, J., V. Vacchina, A. Napolitano, B. Caporiccio, P. Besancon, R. Lobinski y J. M. Rouanet (2001). "Selenium from selenium-rich *Spirulina* is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine in selenium-deficient rats." J Nutr **131**(9): 2343-50.
- Contreras, A., J. C. Corrales, A. Sanchez y D. Sierra (1997). "Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation." J Dairy Sci **80**(11): 2815-9.
- Contreras, A., C. Luengo, A. Sánchez y J. C. Corrales (2003). "The role of intramammary pathogens in dairy goats." Livestock Production Science **79**: 273-283.
- Correa, M. y J. M. Marin (2002). "O=serogroups eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil." Vet. Microbiol. **85**: 125-132.
- Cristaldi, L. A., L. R. McDowell, C. D. Buergelt, P. A. Davis, N. S. Wilkinson y F. G. Martin (2005). "Tolerance of inorganic selenium in wether sheep." Small Rum. Res. **56**: 205-213.
- Chaiyotwittayakun, A., R. J. Erskine, P. C. Bartlett, T. H. Herd, P. M. Sears y R. J. Harmont (2002). "The effect of ascorbic acid and L-histidine therapy on acute mammary inflammation in dairy cattle." J Dairy Sci **85**(1): 60-7.
- Devriese, L. A., M. Baele, M. Vaneechoutte, A. Martel y F. Haesebrouck (2002). "Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows." Vet Microbiol **87**(2): 175-82.
- Djabri, B., N. Bareille, F. Beaudeau y H. Seegers (2002). "Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis." Vet Res **33**(4): 335-57.
- Döpfer, D., R. A. Almeida, T. J. Lam, H. Nederbragt, S. P. Oliver y W. Gaastra (2000). "Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro." Vet Microbiol **74**(4): 331-43.
- dos Santos Nascimento, J., K. R. dos Santos, E. Gentilini, D. Sordelli y C. de Freire Bastos Mdo (2002). "Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-

- producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis." Vet Microbiol **85**(2): 133-44.
- Drackley y J. K. (1999). "Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier." J Dairy Sci **82**: 2259-2273.
- Esfandiari, N., R. K. Sharma, R. A. Saleh, A. J. Thomas, Jr. y A. Agarwal (2003). "Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa." J Androl **24**(6): 862-70.
- Failla, M. L. (2003). "Trace elements and host defense: recent advances and continuing challenges." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1443S-7S.
- Gromer, S., L. Johansson, H. Bauer, L. D. Arscott, S. Rauch, D. P. Ballou, C. H. J. Williams, R. H. Schirmer y E. S. J. Amér (2003). "Active Sites of Thioredoxin Reductases: Why Selenoproteins?" PNAS **100**(No. 22): 12618 - 12623.
- Gunter, S. A., P. A. Beck, T. J. Wistuba, M. E. Davis y J. M. Phillips (2003). "Effects of supplementary selenium source on performance and blood measurements, and immune function in beef cows and their calves." J Anim Sci **81**(4): 856-64.
- Haenlein, G. F. W. (2002). "Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity." Small Rumm.Res. **45**: 163-178.
- Hillerton, J. E. y K. E. Kliem (2002). "Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics." J Dairy Sci **85**(4): 1009-14.
- Hisaeda, K., K. Hagiwara, J. Eguchi, H. Yamanaka, R. Kirisawa y H. Iwai (2001). "Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Levels in Sera and Whey of Cattle with Naturally Occurring Coliform Mastitis." J.Vet. Med. Sci. **63**(9): 1009-1011.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, W. P. Weiss, D. A. Todhunter y W. L. Schockey (1990). "Relationships Among Vitamin E, Selenium, and Bovine Blood Neutrophils." J. Dairy Sci. **73**(9): 2372-2378.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss y K. L. Smith (1993). "Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis." J Dairy Sci **76**(9): 2795-803.
- Hotzel, I. y W. P. Cheevers (2001). "Host range of small-ruminant lentivirus cytopathic variants determined with a selectable caprine arthritis- encephalitis virus pseudotype system." J Virol **75**(16): 7384-91.
- Juniper, D. T., R. H. Phipps, A. K. Jones y G. Bertin (2006). "Selenium Supplementation of Lactating Dairy Cows: Effect on Selenium Concentration in Blood, Milk, Urine, and Feces." J. Dairy Sci. **89**(9): 3544-3551.
- Kaipanen, T., T. Pohjanvirta, N. Y. Shpigel, A. Shwimmer, S. Pyörälä y S. Pelkonen (2002). "Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis." Veterinary Microbiology **85**: 37-46.
- Kaneene, J. B., R. Miller, T. H. Herdt y J. C. Gardiner (1997). "The association of serum nonesterified fatty acids and cholesterol, management and feeding practices with peripartum disease in dairy cows." Prev Vet Med **31**(1-2): 59-72.
- Kelm, S. C., J. C. Dettleux, A. E. Freeman, M. E. Kehrl, Jr., A. B. Dietz, L. K. Fox, J. E. Butler, I. Kasckovics y D. H. Kelley (1997). "Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle." J Dairy Sci **80**(8): 1767-75.
- Khan, A., S. C. Das, T. Ramamurthy, A. Sikdar, J. Khanam, S. Yamasaki, Y. Takeda y G. B. Nair (2002). "Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles

- of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India." J Clin Microbiol **40**(6): 2009-15.
- 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.
- Kiremidjian-Schumacher, L., M. Roy, H. I. Wishe, M. W. Cohen y G. Stotzky (1994). "Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells." Biol Trace Elem Res **41**(1-2): 115-27.
- Knowles, S. O., N. D. Grace, K. Wurms y J. Lee (1999). "Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentrations in grazing cows." J Dairy Sci **82**(2): 429-37.
- Kulberg, S., A. K. Storset, B. Heringstad y H. J. S. Larsen (2002). "Reduced Levels of Total Leukocytes and Neutrophils in Norwegian Cattle Selected for Decreased Mastitis Incidence." J. Dairy Sci. **85**(12): 3470-3475.
- Las Heras, A., L. Dominguez, I. Lopez y J. F. Fernandez-Garayzabal (1999). "Outbreak of acute ovine mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection." Vet Rec **145**(4): 111-2.
- Mallard, B. A., J. C. Dekkers, M. J. Ireland, K. E. Leslie, S. Sharif, C. L. Vankampen, L. Wagter y B. N. Wilkie (1998). "Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health." J Dairy Sci **81**(2): 585-95.
- Martin-Romero, F. J., G. V. Kryukov, A. V. Lobanov, B. A. Carlson, B. J. Lee, V. N. Gladyshev y D. L. Hatfield (2001). "Selenium metabolism in *Drosophila*: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality." J Biol Chem **276**(32): 29798-804.
- Meglia, G. E., A. Johannisson, L. Petersson y K. P. Waller (2001). "Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows." Acta Vet Scand **42**(1): 139-50.
- Middleton, J. R., L. K. Fox, J. M. Gay, J. W. Tyler y T. E. Besser (2002). "Influence of *Staphylococcus aureus* strain-type on mammary quarter milk somatic cell count and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in cattle from eight dairies." J Dairy Sci **85**(5): 1133-40.
- Miller, J. K., E. Brzezinska-Slebozinska y F. C. Madsen (1993). "Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function." J Dairy Sci **76**: 2812-2823.
- Monfardini, E., M. Paape, Y. Wang, A. V. Capuco, M. Husheem, L. Wood y C. Burvenich (2002). "Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition."
- Morgante, M., D. Beghelli, M. Pauselli, P. Dall'Ara, M. Capuccella y S. Ranucci (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.
- Oldfield, J. E. (2003). "Some recollections of early swine research with selenium and vitamin E." J. Anim Sci. **81**(14_suppl_2): E145-148.
- Oliszewski, R., M. S. Kairúz de Núñez, S. N. González de Elias y G. Oliver (2002). "Assessment of beta-glucuronidase levels in goat's milk as an indicator of

- mastitis: comparison with other mastitis detection methods." J Food Prot **65**(5): 864-6.
- Ortman, K. y B. Pehrson (1999). "Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast." J Anim Sci **77**(12): 3365-70.
- Paape, M., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Detilleux y C. Burvenich (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, X. Zhao y J. W. Lee (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 Goats." J. Anim. Sci. **75**: 556-565.
- Paape, M. J., B. Poutrel, A. Contreras, J. C. Marco y A. V. Capuco (2001). "Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants." J. Dairy Sci. **84**(E. Suppl.): E237-E244.
- Park, B., S. Fikrig y E. Smithwick (1968). "Infection and Nitroblue Tetrazolium Reduction by Neutrophils: a diagnostic aid." Lancet **2**: 532.
- Pehrson, B., K. Ortman, 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**(12): 3371-6.
- Persson Waller, K., U. Gronlund y A. Johannisson (2003). "Intramammary infusion of beta1,3-glucan for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **50**(3): 121-7.
- Phuektes, P., P. D. Mansell y G. F. Browning (2001a). "Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis." J Dairy Sci **84**(5): 1140-8.
- Phuektes, P., P. D. Mansell, R. S. Dyson, N. D. Hooper, J. S. Dick y G. F. Browning (2001b). "Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis." J Clin Microbiol **39**(4): 1460-6.
- Pillai, S. R., E. Kunze, L. M. Sordillo y B. M. Jayarao (2001). "Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health." J Dairy Sci **84**(6): 1413-20.
- Prin-Mathieu, C., Y. Le Roux, G. C. Faure, F. Laurent, M. C. Bene y F. Moussaoui (2002). "Enzymatic Activities of Bovine Peripheral Blood Leukocytes and Milk Polymorphonuclear Neutrophils during Intramammary Inflammation Caused by Lipopolysaccharide." Clin Diagn Lab Immunol **9**(4): 812-7.
- Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet y J. Lagace (2001). "Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR." J Clin Microbiol **39**(7): 2584-9.
- Riollet, C., P. Rainard y B. Poutrel (2000). "Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*." Clin Diagn Lab Immunol **2000**: 161-167.
- Riollet, C., P. Rainard y B. Poutrel (2001). "Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection." J Dairy Sci **84**(5): 1077-84.

- Rivas, A. L., F. W. Quimby, J. Blue y O. Coksaygan (2001a). "Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology." J Vet Diagn Invest **13**(5): 399-407.
- Rivas, A. L., F. W. Quimby, O. Coksaygan, A. Alba, A. Arina, M. J. Arrobas, R. N. Gonzalez, H. O. Mohammed y D. H. Lein (2001b). "Expression of CD3 and CD11b antigens on blood and mammary gland leukocytes and bacterial survival in milk of cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis." Am J Vet Res **62**(12): 1840-51.
- Roesler, U. y A. Hensel (2003). "Longitudinal Analysis of *Prototheca zopfii*-Specific Immune Responses: Correlation with Disease Progression and Carriage in Dairy Cows." J. Clin. Microbiol. **41**(3): 1181-1186.
- Roesler, U., H. Scholz y A. Hensel (2001). "Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows." J Clin Microbiol **39**(2): 539-43.
- SAGARPA (2005). "Es México Primer Productor en Caprinocultura de América Latina con Nueve Millones 500 mil Cabezas." Boletín **097/05**.
- Saito, Y., Y. Yoshida, T. Akazawa, K. Takahashi y E. Niki (2003). "Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants." J Biol Chem **278**(41): 39428-34.
- Sánchez, A., C. Fernández, A. Contreras, C. Luengo y J. Rubert (2002). "Effect of intramammary infection by *Staphylococcus caprae* on somatic cell counts and milk composition in goats." J Dairy Res **69**(2): 325-8.
- Sargeant, J. M., K. E. Leslie, J. E. Shirley, B. J. Pulkrabek y G. H. Lim (2001). "Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection in Early Lactation." J.Dairy Science **84**: 2018-2024.
- SAS® (1996). User's Guide: Statistics, Version 6.12.
- Sato, S., H. Hori y K. Okada (1999). "Effect of Vitamin B₂ on Somatic Cell Counts in Milk of Clinical *Staphylococcus aureus* Mastitis." J. Vet. Med. Sci. **61**(5): 569-571.
- Savaskan, N. E., A. U. Brauer, M. Kuhbacher, I. Y. Eyupoglu, A. Kyriakopoulos, O. Ninnemann, D. Behne y R. Nitsch (2003). "Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity." Faseb J **17**(1): 112-4.
- Schlegelova, J., D. Rysanek, I. Sediva y V. Babak (2001). "Comparison of methods for the determination of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **48**(1): 21-9.
- Segal, A. (1974). "Nitroblue Tetrazolium Tests." Lancet **2**: 1248-1252.
- Segal, A. W. (2005). "How neutrophils kill microbes." Annu Rev Immunol **23**: 197-223.
- Seiverd, C. E. (1977). Hematology for Medical Technologists. Philadelphia, Lea&Febiger.
- Sheehan, T. M. y M. Gao (1990). "Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine." Clin Chem **36**(12): 2124-6.
- SIGMA-ALDRICH (s/f). Reducción de Nitroblue Tetrazolium (NBT). Procedimiento número 840.
- Silva, I. D., N. C. Jain y L. W. George (1989). "Phagocytic and nitroblue tetrazolium reductive properties of mature and immature neutrophils and eosinophils from blood and bone marrow from cows." Am J Vet Res **50**(5): 778-81.

- Smith, K. L., J. S. Hogan y W. P. Weiss (1997). "Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality." J Anim Sci **75**(6): 1659-65.
- Song, X. M., J. Perez-Casal, A. Bolton y A. A. Potter (2001). "Surface-expressed mig protein protects *Streptococcus dysgalactiae* against phagocytosis by bovine neutrophils." Infect Immun **69**(10): 6030-7.
- Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver y D. DeRosa (1997). "Immunobiology of the mammary gland." J Dairy Sci **80**(8): 1851-65.
- Spears, J. W. (2003). "Trace mineral bioavailability in ruminants." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1506S-9S.
- Stephan, R., C. Annemuller, A. A. Hassan y C. Lammler (2001). "Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland." Vet Microbiol **78**(4): 373-82.
- Takeuchi, S., T. Maeda, N. Hashimoto, K. Imaizumi, T. Kaidoh y Y. Hayakawa (2001). "Variation of the agr locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis." Vet Microbiol **79**(3): 267-74.
- Thurnham, D. I. (1997). "Micronutrients and immune function: some recent developments." J Clin Pathol **50**(11): 887-91.
- Tollersrud, T., K. Kenny, A. J. Reitz, Jr. y J. C. Lee (2000). "Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States." J Clin Microbiol **38**(8): 2998-3003.
- Tsalev, D. L. (1995). Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice: Progress in Analytical Methodology. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.
- Tsenkova, R., S. Atanassova, K. S. y K. Toyoda (2001). "Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: A new diagnostic tool." J Anim Sci **79**: 2550-2557.
- Van Werven, T., E. N. Noordhuizen-Stassen, A. J. Daemen, Y. H. Schukken, A. Brand y C. Burvenich (1997). "Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli*." J Dairy Sci **80**(1): 67-74.
- Waage, S., T. Mork, A. Roros, D. Aasland, A. Hunshamar y S. A. Odegaard (1999). "Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers." J Dairy Sci **82**(4): 712-9.
- Waage, S., H. R. Skei, J. Rise, T. Rogdo, S. Sviland y S. A. Odegaard (2000). "Outcome of clinical mastitis in dairy heifers assessed by reexamination of cases one month after treatment." J Dairy Sci **83**(1): 70-6.
- Wagter, L. C., B. A. Mallard, B. N. Wilkie, K. E. Leslie, P. J. Boettcher y J. C. Dekkers (2000). "A quantitative approach to classifying Holstein cows based on antibody responsiveness and its relationship to peripartum mastitis occurrence." J Dairy Sci **83**(3): 488-498.
- Waller, K. P. (2000). "Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics." Adv Exp Med Biol **480**: 231-45.
- Weiss, W. P. (2003). "Selenium nutrition of dairy cows: comparing responses to organic and inorganic selenium forms." Nutritional Biotechnology in the Feed and Industries: 333-343.

- Weiss, W. P. y J. S. Hogan (2005). "Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows." *J Dairy Sci* **88**(12): 4366-74.
- Wellenberg, G. J., C. J. Bruschke, H. J. Wisselink, H. W. Barkema y J. T. Van Oirschot (2002). "Simultaneous intramammary and intranasal inoculation of lactating cows with bovine herpesvirus 4 induce subclinical mastitis." *Vet Microbiol* **86**(1-2): 115-29.
- Wellenberg, G. J., W. H. van der Poel, T. J. van der Vorst, P. H. van Valkengoed, Y. H. Schukken, F. Wagenaar y J. T. Van Oirschot (2000). "Bovine herpesvirus 4 in bovine clinical mastitis." *Vet Rec* **147**(8): 222-5.
- Wellenberg, G. J., E. R. Verstraten, S. Belak, S. B. Verschuren, F. A. Rijsewijk, R. Peshev y J. T. Van Oirschot (2001). "Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk." *J Virol Methods* **97**(1-2): 101-12.
- Whanger, P. D. (2002). "Selenocompounds in plants and animals and their biological significance." *J Am Coll Nutr* **21**(3): 223-32.
- Wilson, D. J., R. N. Gonzalez y H. H. Das (1997). "Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production." *J Dairy Sci* **80**(10): 2592-8.
- Yazdankhah, S. P., H. Sorum, H. J. Larsen y G. Gogstad (2001). "Rapid method for detection of gram-positive and -negative bacteria in milk from cows with moderate or severe clinical mastitis." *J Clin Microbiol* **39**(9): 3228-33.
- Younan, M., Z. Ali, S. Bornstein y W. Muller (2001). "Application of the California mastitis test in intramammary *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* infections of camels (*Camelus dromedarius*) in Kenya." *Prev Vet Med* **51**(3-4): 307-16.
- Young, B. F., D. Platt, D. Logue, H. Ternent y J. Fitzpatrick (2001). "Bovine *Staphylococcus aureus* mastitis: strain recognition and dynamics of infection." *J Dairy Res* **68**(3): 377-88.
- Zadoks, R. N., H. G. Allore, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, Y. T. Gröhn y Y. H. Schukken (2001a). "Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis." *J Dairy Sci* **84**(3): 590-599.
- Zadoks, R. N., H. G. Allore, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, G. J. Wellenberg, Y. T. Grohn y Y. H. Schukken (2001b). "Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis." *J Dairy Sci* **84**(12): 2649-63.
- Zadoks, R. N., H. G. Allore, B. H.W., O. C. Sampimon, G. J. Wellenberg, Y. T. Gröhn y Y. H. Schukken (2001c). Cow and quarter level risk factors for *Streptococcus uberis*, and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. of Dairy Science*. **84**: 2649-2663.
- Zhang, S. y C. W. Maddox (2000). "Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis." *Infect Immun* **68**(3): 1102-8.