

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

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



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

**POR:**

**ALMA ANGELINA GARCIA RUIZ**

**TESIS:**

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

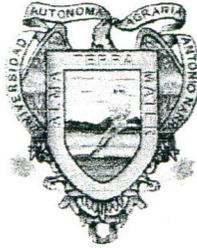
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Torreón, Coahuila, México.**

**Febrero del 2006.**

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

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



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

**POR:**

**ALMA ANGELINA GARCIA RUIZ**

**ASESOR PRINCIPAL**

  
**DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ**

**COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

  
**M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA**

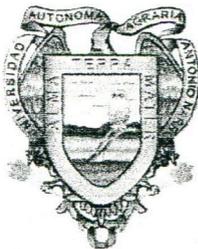
  
Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL

Torreón, Coahuila, México.

Febrero del 2006.

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

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**PRESIDENTE DE JURADO**

**DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ**

**VOCAL**

**M. C. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA**

**VOCAL**

**Q. B. P. MARGARITA Y. MENDOZA RAMOS**

**VOCAL SUPLENTE**

**M. C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE**

Torreón, Coahuila, México.

Febrero de 2006.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MINERALES TRAZA Y SISTEMA INMUNE.....	4
COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE.....	5
NEUTRÓFILOS.....	7
FUNCIÓN DE NEUTRÓFILOS.....	7
ESTRUCTURA DEL NEUTRÓFILO.....	7
MORFOLOGÍA MICROSCOPICA DE LOS NEUTROFILOS.....	9
GRANULOCINÉTICA Y GRANULOPYESIS.....	10
<i>Migración de los PMN de la sangre a los tejidos.....</i>	<i>10</i>
OPSONIZACIÓN, FAGOCITOSIS Y MUERTE INTRACELULAR.....	11
<i>Diapédesis de PMN.....</i>	<i>11</i>
<i>Fagocitosis.....</i>	<i>12</i>
MECANISMO OXIDATIVO DE DESTRUCCIÓN EN LOS FAGOCITOS.....	12
ESPECIES OXIGENO REACTIVAS.....	13
ESTRÉS OXIDATIVO Y SALUD ANIMAL.....	13
LA DEFENSA ANTIOXIDANTE Y SU RELACIÓN CON DIFERENTES ENFERMEDADES.....	14
CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES.....	14
FUNCIÓN ANTIOXIDANTE DEL SELENIO.....	15
DISTRIBUCIÓN Y APLICACIÓN DEL SELENIO.....	16
ADMINISTRACIÓN RECOMENDADA EN LA DIETA.....	17
VÍA DE ADMINISTRACIÓN DEL SELENIO.....	18
METABOLISMO Y ABSORCIÓN DEL SELENIO.....	19
IMPORTANCIA Y BENEFICIO DEL SELENIO.....	20
EL SELENIO Y LA VITAMINA E.....	21
TRASTORNOS PROVOCADOS POR DEFICIENCIA DE SELENIO.....	23
COMPARANDO FUENTES DE SELENIO.....	23
SE INORGÁNICO VS SE ORGÁNICO.....	24
EFEECTO DEL SELENIO SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO.....	28
MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	29
GRUPOS EXPERIMENTALES.....	29
TOMA DE MUESTRAS.....	30
EQUIPO.....	30
SOLUCIONES.....	30
METODOLOGÍA.....	31

TÉCNICA PARA LA CUENTA TOTAL DE LEUCOCITOS SANGUÍNEOS .....	31
TÉCNICA PARA LA CUENTA DIFERENCIAL EN FROTIS SANGUÍNEO .....	32
MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	32
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
RESULTADOS DE LA CUENTA TOTAL DE LEUCOCITOS SANGUÍNEOS .....	33
RESULTADOS DE LA CUENTA DIFERENCIAL EN FROTIS SANGUÍNEO .....	34
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIÓN .....	36
LITERATURA CITADA .....	37

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mecanismo y tipo de barreras de defensa.....	6
Cuadro 2. Leucocitos totales por $\mu$ l de sangre y porcentaje de cada leucocito.....	11
Cuadro 3. Evaluación del estado de Se en ganado alimentado con selenito.....	18
Cuadro 4. LSMEANS de Leucocitos Totales (ml) en sangre de ovejas suplementadas (n=5) con Selenio orgánico (0.2 mg/d) y en ovejas sin suplemento (n=5) de Selenio orgánico.....	33
Cuadro 5. LSMEANS de Neutrófilos Totales (ml) en sangre de ovejas suplementadas (n=5) con Selenio orgánico (0.2 mg/d) y en ovejas sin suplemento (n=5) de Selenio orgánico.....	34

## DEDICATORIAS

### **A DIOS**

Por darme la oportunidad de estar aquí y ser la fortaleza que me permitió cumplir uno de mis más importantes anhelos.

### **A MIS PADRES**

#### **PABLO GARCÍA GARCÍA Y ALICIA RUÍZ NUÑEZ**

Por darme la oportunidad de estar aquí, por ser mi absoluto ejemplo a seguir, por el apoyo incondicional y sobretodo por su amor.

### **A MIS HERMANOS**

#### **BEHELEM GARCIA RUIZ Y PABLO GARCIA RUIZ**

Por su apoyo, pero sobretodo por estar en los momentos mas precisos de mi vida.

**MUCHAS GRACIAS.**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MI ALMA TERRA MATER.**

Por cobijarme en su seno y abrirme las puertas del conocimiento y la sabiduría.

### **AL COECyT.**

Por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

**AL LABORATORIO ALTECH DE MÉXICO. POR PROPORCIONARNOS EL** Sel-Plex\* para poder llevar acabo este experimento

### **A MIS ASESORES.**

Al Dr. Rafael Rodríguez Martínez, al M. C. José Luis Corona Medina y en especial a su colaboradora la Q.B.P. Margarita Mendoza Ramos por brindarme su apoyo y paciencia durante la realización de este trabajo.

### **A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE CLASES**

## RESUMEN

Existe una compleja interdependencia entre ciertos micronutrientes, la función inmune y la resistencia a enfermedades. Los elementos traza (Se, Zn, Fe y Cu) son requeridos para desempeñar diferentes actividades y numerosas funciones de las células inmunes. Si la función del sistema inmune se deteriora debido a una deficiencia de estos, puede incrementar el riesgo de mortalidad y morbilidad debida a infecciones virales, microbianas y parasitarias.

El selenio es un componente importante de la enzima glutatión-peroxidasa, que es esencial para proteger a las células y tejidos del daño auto-oxidativo debido a la producción de radicales libres. El selenio es necesario para el funcionamiento apropiado de neutrófilos, macrófagos, células NK, linfocitos T y algunos otros mecanismos inmunes. Una deficiencia en selenio da como resultado una migración reducida de neutrófilos hacia el sitio de infección, deficiencias en el procesamiento por muerte intracelular en los neutrófilos y baja producción de peróxido de hidrógeno extracelular. Al evaluar la función de los neutrófilos en animales selenodeficientes, se revela un posible incremento en enfermedades infecciosas, aumenta la acumulación de  $H_2O_2$  y disminuye la concentración de enzimas; lo último, se ha ligado a la producción de radicales oxigenotóxicos, que disminuyen la viabilidad y reducen la capacidad de destrucción intracelular de patógenos. Cuando las especies oxígeno reactivas no son removidas eficazmente, el estrés oxidativo puede deteriorar la salud de las ovejas en forma directa, incluyendo daño oxidativo hacia lípidos y proteínas y en forma indirecta causando daño en las membranas celulares y sus componentes pueden modificar las vías metabólicas provocando alteraciones fisiológicas y algunas patologías. La vit. E y el Se reducen este efecto, debido a que comparten el papel de antioxidantes y neutralizan parcialmente el efecto negativo de las especies oxígeno reactivas.

Por mucho tiempo solo el selenito y el selenato de sodio (Se inorgánico) se usaron como fuente de suplementación en ganado lechero y de engorda. Sin embargo existen reportes que indican los beneficios de utilizar una fuente de selenio orgánico en forma de levadura de Se (Sel-Plex™) que puede ser mejor aprovechado por el organismo al ser comparado con el Se inorgánico; estas comparaciones se han hecho usando diferentes métodos para analizar las concentraciones de Se: en sangre total, plasma, leche, en varios tejidos, incluso medir la actividad de la selenoenzima GSH-Px en sangre total.

Si la suplementación con selenio en la dieta de los animales tiene influencia en la mejora de la respuesta inmune innata, es de esperar que exista un incremento en el número de leucocitos sanguíneos y en particular neutrófilos. Entonces el objetivo del presente trabajo es determinar los números de leucocitos totales y de neutrófilos en sangre de ovejas suplementadas en forma oral con 2 ppm/ día de Se orgánico durante 2 meses, para lo cual se utilizaron 10 ovejas jóvenes, nulíparas, que fueron distribuidas en forma

aleatoria en dos grupos, en los que recibieron uno de los siguientes tratamientos: Primer grupo (n=5) suplementadas con Se orgánico (2.0 mg diarios, del producto de la levadura de Se [Sel-Plex\* de de Lab. Altech de México] en la dieta. El segundo grupo (n=5) que fue el grupo control con dieta normal sin suplementación. A ambos grupos se les tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos Vacutainer\* con EDTA como anticoagulante, para realizar las siguientes pruebas en el laboratorio: Cuenta de leucocitos totales/ml de sangre y determinar la cuenta diferencial en frotis sanguíneo de sangre periférica para conocer el número de neutrófilos. Para la interpretación de los resultados obtenidos se usó el método de análisis estadístico "ANOVA" para determinar el nivel de significancia que se obtuvieron en el experimento al comparar grupos, uno con otro o entre miembros de un mismo grupo.

**PALABRAS CLAVE:** neutrófilos, leucocitos sanguíneos, células PMN, deficiencias, infecciones, enfermedades, nutrición, producción, nutrientes, micronutrientes, daño oxidativo, bacterias, sangre.

## INTRODUCCIÓN

Es reconocido que los elementos traza son requeridos para desempeñar diferentes actividades y numerosas funciones de las células inmunes, pero el papel específico de estos micronutrientes inorgánicos no está definido (Failla 2003).

El Se ha recibido mayor atención en Investigaciones hechas en el último cuarto del s. XX, ya que es esencial para una eficiente y efectiva operación de muchos aspectos del sistema inmune (en la selección, maduración y activación de algunos eventos de las células inmunes) tanto en animales como en humanos (Arthur, McKenzie *et al.* 2003), lo cual ha sido comprobado con la disponibilidad de herramientas tales como la biología celular analítica, la genética molecular y otras tecnologías. El impacto enlista deficiencias provocadas por elementos traza y además problemas genéticos, y en numerosas actividades efectuadas por varias clases de leucocitos sanguíneos, médula ósea y órganos linfoides. los datos obtenidos se enlistan en las siguientes conclusiones:

1. Un suministro inadecuado de estos elementos esenciales se asocia con una supresión de numerosas actividades celulares en el sistema inmune.
2. Las alteraciones observadas en cualquiera de estos elementos esenciales, pueden reflejar una disminución en la actividad de las células individuales, un descenso en el número total de células efectoras en uno o más tejidos o se pueden presentar en conjunto viéndose disminuida la capacidad de cada célula
3. La función del sistema inmune se deteriora, debido a una deficiencia de elementos traza, que puede ser suficiente para incrementar el riesgo de mortalidad y morbilidad debida a infecciones virales, microbianas y parasitarias.

4. Si la deficiencia de los elementos traza cambia, se restablece la inmunocompetencia (Failla 2003).

## **MINERALES TRAZA Y SISTEMA INMUNE**

En varias partes del mundo, las carencias en minerales traza y otros nutrientes esenciales son consideradas limitantes para la producción del ganado y además provocan trastornos en el metabolismo animal. Aunque muchas de estas deficiencias son marginales o moderadas, algunos tipos celulares y sus actividades realizadas, parecen ser particularmente sensibles a dichas deficiencias, ocasionando desórdenes irreconocibles que reducen el desempeño y la productividad. La deficiencia de un número de elementos traza en particular altera la secreción de factores extracelulares que ajustan las actividades de las células inmunológicas y otro tipo de células que participan en la respuesta del hospedero a agentes irritantes e infecciones, identificándose entonces como factores importantes en el propio funcionamiento del sistema inmune (Bull 2000; Failla 2003).

Existe una compleja interdependencia entre ciertos micronutrientes, la función inmune y la resistencia a enfermedades. Según Thurnham (1997), el resultado principal provocado por una deficiencia de micronutrientes (Se, Cu, vit. E y Co) tiene un efecto directo en la reducción del volumen celular, que puede afectar indirectamente la función de células inmunes, particularmente los linfocitos T, y que pueden influir directamente sobre la virulencia y en adición provocar un trastorno en el sistema inmune (Thurnham 1997; Failla 2003).

Actualmente los nutriólogos formulan dietas con la esperanza de que éstas proporcionen el máximo potencial para el desarrollo, mantenimiento y respuesta del sistema inmune. El desarrollo del sistema inmune requiere primeramente energía para la diferenciación leucocitaria, el sistema inmune de mantenimiento requiere de sustratos adecuados para mantener la población de células y la producción de macromoléculas, por lo tanto la activación de la

respuesta inmune requiere de una demanda nutricional mayor (Weber 1995; Humprey, Koutsos *et al.* 2002; Weiss 2003).

En la respuesta inmune se han usado modelos *in vitro* involucrando diferentes tipos de células inmunes de animales que consumen dietas con diferentes concentraciones de nutrientes en una respuesta medida y los efectos nutricionales *in vivo* comprende diferentes dietas combinadas experimentalmente o inyectadas para medir dicha respuesta, resultando de apoyo útil el ganado lechero, de engorda y las ovejas (Weber 1995; Weiss 2003). Para evaluar el estado nutricional se utilizan marcadores bioquímicos como: concentraciones de ascorbato en leucocitos y plasma, el retinol plasmático y niveles de Fe y Zn. Sin embargo, el uso de dichos marcadores puede sobrestimar el grado de deficiencia nutricional, principalmente si se acompaña de enfermedades que pueden disminuir las concentraciones de los nutrientes como parte de los cambios que acompañan a la fase aguda (Thurnham 1997; Spears 2000).

Cuando el suplemento de micronutrientes suministrado es limitado, la resistencia a enfermedades puede tener prioridad por algunos nutrientes, que son más críticos para la supervivencia, pero algunos de estos efectos son contradictorios por el hecho de que las enfermedades pueden disminuir las concentraciones de micronutrientes en el plasma y esto se pueden malinterpretar como una deficiencia. Las deficiencias de micronutrientes no siempre aumentan la susceptibilidad de los animales hacia las enfermedades inducidas experimentalmente o en forma natural, pero si difieren de los estudios hechos en animales sanos (Thurnham 1997; Spears 2000).

## **COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE**

La inmunidad es el estado de protección contra enfermedades infecciosas y tiene dos componentes: uno inespecífico o *inmunidad innata*, que proporciona la primera línea de defensa contra la infección y en el que casi

todos los componentes se encuentran antes del inicio de la infección, constituyendo un grupo de mecanismos de resistencia contra la enfermedad que no son específicos de un patógeno en particular, sino que incluyen componentes celulares y moleculares. (Cuadro 1). El otro, es el componente específico o *inmunidad adaptativa*, que no actúa hasta que existe un reto antigénico para el organismo, respondiendo al desafío con un grado elevado de especificidad y con la propiedad de "memoria", observándose una reacción inmunitaria adaptativa contra un antígeno en el transcurso de 5-6 días después de la exposición inicial a ese antígeno.

**Cuadro 1. Mecanismo y tipo de barreras de defensa**

Tipo	Mecanismo
<b>Barrera anatómica</b>	
Piel	La barrera mecánica retarda la entrada de microbios.
Mucosas	El ambiente ácido (pH 3-5) retarda el crecimiento microbiano. La flora normal compite con microbios por sitios de fijación y nutrientes. El moco atrapa microorganismos extraños. Los cilios impulsan microorganismos fuera del cuerpo.
<b>Barreras fisiológicas</b>	
Temperatura	La temperatura normal del cuerpo inhibe el crecimiento de algunos patógenos.
pH bajo	La respuesta febril inhibe el crecimiento de algunos patógenos.
Mediadores químicos	La acidez del contenido gástrico destruye la mayor parte de los microorganismos ingeridos. La lisozima segmenta la pared de la célula bacteriana. El interferón induce un estado antiviral en células no infectadas. El complemento lisa microorganismos o facilita la fagocitosis. Los receptores parecidos a peaje reconocen moléculas microbianas, señal para que las células secreten citocinas no estimulantes. Las colectinas alteran la pared celular de patógenos.
<b>Barreras fagocíticas/ endocíticas</b>	Diversas células internalizan (endocitosis) y descomponen macromoléculas extrañas. Las células especializadas (monocitos y neutrófilos sanguíneos, macrófagos tisulares) internalizan (fagocitosis), destruyen y digieren microorganismos completos.
<b>Barreras inflamatorias</b>	El daño del tejido y la infección inducen el escape de líquido vascular que contienen proteínas sericas con actividad antibacteriana y la migración de células fagocíticas hacia el área afectada.

Tomado de: Goldsby, R., T. J. Kindt, *et al.* (2004). *Inmunología*. Inmunología. M. Hill. Mexico: 5-23.

La respuesta inmunitaria ocurre cuando un antígeno, (virus, bacteria) invade los tejidos del hospedero, la sustancia extraña es inactivada o destruida por medio de una compleja interacción entre macrófagos y linfocitos. Los linfocitos T (inmunidad celular) tienen múltiples funciones, como la producción de linfocinas, la actividad citotóxica y la activación o supresión de los linfocitos B. Los linfocitos B (inmunidad humoral) cuando responden a un antígeno, se diferencian en células de memoria o en células plasmáticas productoras de anticuerpos. En la respuesta primaria, los anticuerpos son principalmente IgM, que van cambiando a IgG. En la respuesta secundaria, la mayor parte de los anticuerpos producidos son IgG (Weber 1995; Weiss 2003).

## **NEUTRÓFILOS**

### **FUNCIÓN DE NEUTRÓFILOS**

La función y destrucción de los microorganismos esta mediada por los fagocitos, es decir, los neutrófilos en las primeras fases de la respuesta inmunitaria innata y los macrófagos en las fases tardías de la misma. Los neutrófilos, también denominados leucocitos polimorfonucleares (PMN), son la población de leucocitos circulantes más abundante y median las fases iniciales en las respuestas inflamatorias (Abbas, Lichtman *et al.* 2002; Paape, Bannerman *et al.* 2003).

### **ESTRUCTURA DEL NEUTRÓFILO**

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

La célula está delimitada por una membrana plasmática que tiene un número de receptores funcionales importantes; algunos receptores son utilizados para detectar quimioatrayentes que permiten que los PMN emigren a áreas de inflamación (componentes de complemento C5 y C3, LPS, IL-1, IL-2 e IL-3) que se unen específicamente a receptores de la membrana plasmática de los PMN. Los receptores de adherencia mantienen los cilios en movimiento a través del endotelio y dentro del sitio de la infección, estos incluyen la L-selectina y la  $\beta_2$ -integrina, moléculas de adherencia asociadas con la unión de PMN a células endoteliales. Los receptores de membrana, se unen a las inmunoglobulinas IgM e IgG<sub>2</sub> y al componente del complemento C3b, permitiendo que los PMN inicien la fagocitosis y sus funciones bactericidas. La muerte o apoptosis de los PMN expresa receptores que los marcan para una disposición rápida de los macrófagos. Otro grupo de receptores se unen a toxinas bacterianas y citocinas que inician la fosforilación de la proteína tirosina para la síntesis y expresión de receptores de superficie importantes que el hospedador usa como defensa (Paape, Mehrzad *et al.* 2002; Paape, Bannerman *et al.* 2003).

La característica más predominante de los PMN es su núcleo multilobulado, este es importante porque permite alinear sus lóbulos nucleares en una línea delgada, permitiendo una migración rápida entre las células endoteliales. Dentro del citoplasma hay islas de glucógeno que constituye el 20% de la célula en una base de peso seco y la membrana limita los numerosos gránulos que son usados por la célula para matar a las bacterias (Abbas, Lichtman *et al.* 2002; Paape, Mehrzad *et al.* 2002; Burvenich, Monfardini *et al.* 2004; Goldsby, Kindt *et al.* 2004).

Como en otras especies, los PMN de borregos contienen dos tipos de gránulos: Los *gránulos azurofílicos* (primarios) que están representados por lisosomas y contienen mieloperoxidasa (MPO), hidrolasas ácidas (fosfatasa ácida y glucoronidasa) y proteasas (elastasa y catepsina), cuyo mecanismo antibacteriano más importante es la hidrógeno mieloperoxidasa y el sistema de

haluro de peróxido. En presencia de peróxido de hidrógeno y de iones de haluro la MPO elimina a las bacterias, y los *gránulos específicos* (secundarios) que contienen lisozimas, fosfatasa alcalina (NAP) y lactoferrina (en contraste a la transferrina), la lactoferrina es capaz de unirse al Fe en un pH bajo, colagenasa y NAD (P) H oxidasa. Estos gránulos se desarrollan después de los azurofilicos, son más pequeños y no se tiñen intensamente con colorantes básicos ni ácidos (hematoxilina y eosina, respectivamente) (Abbas, Lichtman *et al.* 2002; Paape, Mehrzad *et al.* 2002; Burvenich, Monfardini *et al.* 2004; Goldsby, Kindt *et al.* 2004).

Existe un tercer nivel de gránulos más largos, densos y numerosos que los otros dos gránulos, estos gránulos contienen lactoferrina que también se encuentra en los gránulos específicos, además contienen un grupo de proteínas altamente catiónicas y son el almacén exclusivo de los poderosos compuestos bactericidas independientes de oxígeno (Abbas, Lichtman *et al.* 2002; Paape, Mehrzad *et al.* 2002; Burvenich, Monfardini *et al.* 2004; Goldsby, Kindt *et al.* 2004).

## **MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE LOS NEUTRÓFILOS**

Cuando los PMN del frotis sanguíneo se tiñen con Wright, y se examinan con microscopia de luz, lo que se observa es un citoplasma claro que contiene numerosos gránulos citoplasmáticos ligeramente rosas, los lóbulos nucleares están conectados por pequeños filamentos. Los PMN maduros contienen un núcleo segmentado polimórfico. Los PMN inmaduros (mielocitos, metamielocitos y en banda) rara vez se encuentran en sangre de animales sanos, sin embargo es normal encontrarlos en medula ósea. Los PMN en banda son del mismo tamaño y color que los PMN maduros, el núcleo tiene forma de herradura y no es segmentado. Se clasifican en banda por lo menos al 60% de los que se encuentran paralelos a los lados del núcleo y la pared. Los mielocitos contienen un núcleo redondo y citoplasma azul tenue (Paape, Bannerman *et al.* 2003).

Para los ojos inexpertos, estas células se pueden confundir con linfocitos. De cualquier forma los mielocitos contienen mas citoplasma y el núcleo está desprovisto de cromatina plasmática (Paape, Bannerman *et al.* 2003). Los metamielocitos también contienen un citoplasma de color azul tenue y el núcleo es en forma de riñón o frijol. En las ovejas solo el 25-30% del conteo total son leucocitos PMN. Además los PMN maduros se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos (Abbas, Lichtman *et al.* 2002; Paape, Bannerman *et al.* 2003).

## **GRANULOCINÉTICA Y GRANULOPOYESIS**

Existen tres fases durante la vida de los PMN: La fase intramedular, que consiste en la proliferación (mieloblastos, promielocitos y mielocitos), la fase de maduración (metamielocitos y células en banda) y la fase de almacenamiento de los PMN (maduros) en medula ósea. El tiempo que tardan los PMN en llegar a la sangre es de 7.01 días. Si un neutrófilo circulante no es reclutado a un sitio de inflamación, experimenta apoptosis y suele ser fagocitado por macrófagos residentes en el hígado y el bazo. Por consiguiente, son las células efectoras dominantes de las fases tardías de la respuesta inmune innata, uno o dos días después de la infección, ya que al tener una vida más larga, no están terminalmente diferenciados y se pueden dividir en el sitio de la inflamación (Abbas, Lichtman *et al.* 2002; Paape, Bannerman *et al.* 2003).

### **Migración de los PMN de la sangre a los tejidos**

El ciclo de vida de los PMN es corto. En la medula ósea estas células requieren 10-14 días para madurar, después de la cual pueden ser almacenados por algunos días adicionales. Los PMN maduros abandonan el compartimiento hematopoyético de la medula ósea y entran al seno vascular para viajar por el canal de emigración a través del endotelio celular, adyacente a la unión del endotelio intracelular. Los PMN deambulan brevemente en la circulación sanguínea (8.9 hrs. vida media) abandonando la circulación por diapédesis entre las células endoteliales, entrando en lo tejidos, donde

funcionan como fagocitos por 1-2 días. Los PMN viejos son removidos por macrófagos cuando sufren apoptosis. En los animales sanos, la producción y destrucción de PMN se regula intensamente, lo cual mantiene el número constante en sangre, leche y tejidos (Paape, Mehrzad *et al.* 2002; Burvenich, Monfardini *et al.* 2004). Las cantidades totales de leucocitos en sangre de distintas especies se describen en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Leucocitos totales por  $\mu$ l de sangre y porcentaje de cada leucocito**

Especie	Cuenta leucocitaria total (intervalo)	Neutrófilos %	Linfocitos %	Monocitos %	Eosinófilos %	Basófilos %
Cabra	8000-12000	35-40	50-55	5	2-5	<1
Ovejas	7000-10000	25-30	60-65	5	2-5	<1
Vacas	7000-10000	25-30	60-65	5	2-5	<1

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

## OPSONIZACIÓN, FAGOCITOSIS Y MUERTE INTRACELULAR

El proceso de opsonización, aunque no es esencial para la fagocitosis, promueve la fijación de la bacteria por el PMN. El reconocimiento inmunológico es llevado a cabo principalmente por anticuerpos específicos (IgM e IgG<sub>2</sub>), que reconocen a la bacteria a través de las regiones Fab y se unen a los PMN por medio de los receptores Fc en la membrana plasmática del PMN. La activación de complemento también promueve la fagocitosis. Las proteínas de complemento C3b y C3bi, originadas en la superficie bacteriana y que se unen al anticuerpo, son reconocidas respectivamente por receptores CR1 y CR3 localizados en la membrana celular del PMN (Paape, Mehrzad *et al.* 2002; Burvenich, Monfardini *et al.* 2004).

### Diapédesis de PMN

El proceso de salida de los PMN (diapédesis) utiliza las reservas energéticas de los PMN, necesarias para la fagocitosis y eliminación de

patógenos invasores y requiere de la quimiotaxis, la cual dirige la migración positiva de una célula a lo largo de un gradiente químico quimotáctico y además es un componente esencial del sistema inmune para la inmunidad innata y adquirida. El componente del complemento C5 es uno de los agentes quimiotácticos más potentes e induce diapédesis con una dosis de respuesta del PMN que se bloquea por los anticuerpos monoclonales a C5a (Paape, Bannerman *et al.* 2003; Burvenich, Monfardini *et al.* 2004).

## **Fagocitosis**

Los PMN están completamente equipados para luchar contra las bacterias invasoras, son potencialmente fagocíticos, puesto que la proporción nativa de fagocitos es muy baja, produciendo una más rápida ingestión y eliminación de los patógenos. El proceso de fagocitosis consiste en el englobamiento de partículas ( $>0.5 \mu\text{m}$  diam). Cada fagocito (PMN y macrófagos) utiliza receptores de superficie (receptor Fc) para unirse a un microorganismo, extendiendo una proyección de su membrana en forma de copa alrededor de éste y cerrando la porción superior, de tal forma que separa el interior para formar una vesícula intracelular denominada fagosoma, conteniendo la partícula extraña fagocitada que se separa de la membrana plasmática, eliminando al patógeno (Morgante, Beghelli *et al.* 1999; Abbas, Lichtman *et al.* 2002).

## **MECANISMO OXIDATIVO DE DESTRUCCIÓN EN LOS FAGOCITOS**

Cuando la fagocitosis se activa los PMN aumentan el consumo de  $\text{O}_2$ . Segundos después del reconocimiento y de la fagocitosis, las células consumen oxígeno en el estallido respiratorio. Los PMN se reactivan y generan poderosas especies oxígeno reactivas (ROS). El difosfato de nicotinamida adenina (NADPH) se activa y reduce el oxígeno a superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). La superóxido dismutasa (SOD) convierte el superóxido a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y este puede reaccionar con nuevas formas de aniones superóxidos y por la reducción parcial de  $\text{O}_2$  produce un radical hidroxilo altamente reactivo (OH).

Estos potentes oxidantes y radicales liberados, bañan y matan a las bacterias ingeridas (Morgante, Beghelli *et al.* 1999; Paape, Mehrzad *et al.* 2002).

## **ESPECIES OXIGENO REACTIVAS**

Las ROS como el  $O_2$  y el  $H_2O_2$ , son productos indeseables de un proceso metabólico normal, usados por los fagocitos para eliminar bacterias. Su cantidad se puede incrementar marcadamente por factores exógenos (radiación solar, hiperoxia, isquemia, toxinas funguicidas y pesticidas). Cuando los ROS no son removidos eficazmente, el estrés oxidativo puede deteriorar la salud en forma directa, incluyendo daño oxidativo hacia lípidos y proteínas y en forma indirecta, causando daño en las membranas celulares, y sus componentes pueden modificar las vías metabólicas provocando alteraciones tanto patológicas como fisiológicas. Varios sistemas de defensa han evolucionado para combatir la acumulación de ROS que incluyen varias moléculas no enzimáticas, (glutación, vitaminas A, C y E y flavonoides) así como los recogedores de residuos enzimáticos de ROS (SOD, catalasa y peroxidasa glutatiónica), los que desgraciadamente no siempre son adecuados para contrarrestar la producción de ROS, provocando un estado de estrés oxidativo (Madamanchi, Li *et al.* 2001; Martindale and Holbrook 2002).

## **ESTRÉS OXIDATIVO Y SALUD ANIMAL**

El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes. Normalmente el cuerpo está protegido por un amplio rango de sistemas antioxidantes que trabajan en conjunto. Los catalizadores metálicos de las reacciones oxidativas son eliminados en los fluidos extracelulares por macromoléculas atraparoras de metales. Dentro de las células, la SOD, la peroxidasa glutatiónica y la catalasa remueven el  $O_2$  y el  $H_2O_2$  antes de que reaccionen con metales catalíticos (Fe y Cu) para formar especies reactivas. Finalmente, la cadena de reacciones peroxidativas iniciadas por especies reactivas que escaparon de la degradación enzimática se termina por la cadena

de antioxidantes incluyendo el ascorbato, agua, urea, vit. E, ubiquinona, Zn, Cu y  $\beta$ -carotenos, que funcionan para mantener bajas las concentraciones de ROS y los hidroperóxidos de lípidos en los tejidos (Burton, Madsen *et al.* 2001).

## **LA DEFENSA ANTIOXIDANTE Y SU RELACIÓN CON DIFERENTES ENFERMEDADES**

Se ha demostrado que el organismo posee un número de mecanismos a través de los cuales produce y a la vez limita la producción de ROS. Los radicales libres como el radical  $O_2$  y el radical OH ocasionan numerosas enfermedades que provocan reacciones en cadena y que solo son eliminados por la acción de otras moléculas que se oponen a este proceso tóxico en el organismo, los llamados sistemas antioxidantes defensivos que disminuyen la incidencia de enfermedades con suplementos individuales de antioxidantes. De ellos, un primer grupo trabaja sobre la cadena del radical inhibiendo los mecanismos de activación, un segundo grupo (SOD y catalasa, productores de peroxidasa glutatiónica), neutraliza la acción de los radicales libres ya formados, deteniendo la cadena de propagación. Las enzimas utilizan en su mayoría minerales trazas como cofactores para sus reacciones. Un exceso de radicales libres suele iniciar el daño de la pared vascular y en este proceso se encuentra implicado el colesterol LDL (Awadeh, Kincaid *et al.* 1998; Céspedes y Sánchez 2000).

## **CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES**

Los antioxidantes relevan el efecto de los radicales libres de oxígeno y la producción de peróxido lipídicos, clasificándose en primarios, secundarios y terciarios, dependientes de su función (Awadeh, Kincaid *et al.* 1998; Céspedes y Sánchez 2000; Nambiar, Fisher *et al.* 2002).

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

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

El segundo grupo de antioxidantes, los Secundarios No Enzimáticos se divide en 2 subgrupos.

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

Dentro de los antioxidantes terciarios, encargados de reparar biomoléculas dañadas por los radicales libres, se incluyen las proteasas reparadoras de ADN y la Metionina sulfóxido reductasa (Awadeh, Kincaid *et al.* 1998; Céspedes y Sánchez 2000).

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

## **FUNCIÓN ANTIOXIDANTE DEL SELENIO**

El Se es un micronutriente esencial presente en tejidos corporales. Es importante fisiológicamente porque es un componente integral de la enzima celular peroxidasa glutatiónica (GSH-Px) que ayuda a destruir ciertos peróxidos tóxicos dentro de las células corporales. Se cree que la actividad de la GSH-Px

es la función más importante del Se en los animales, pues las concentraciones tanto tisulares como sanguíneas del Se están altamente relacionadas con la actividad de la GSH-Px y relacionadas directamente a la entrada de Se. Durante el metabolismo del oxígeno dentro de las células, se producen grandes cantidades de  $O_2$  y  $H_2O_2$  y pueden dañar severamente la membrana lipídica, el ADN, las proteínas celulares y las enzimas. La función específica de la GSH-Px es la conversión de  $H_2O_2$  a agua y los hidroperóxidos lipídicos al alcohol correspondiente. Cuando la concentración del  $H_2O_2$  es baja, hay menos cambio en los radicales OH que se formarán. El radical OH es una ROS extremadamente dañino para las células (Smith, Hogan *et al.* 1997; Swecker 1997; Bull 2000).

Sholz y Hutchinson determinaron que la actividad de la GSH-Px difiere entre el plasma, los eritrocitos y los neutrófilos, siendo cuatro veces mayor en los leucocitos que en los eritrocitos. En los eritrocitos y en los neutrófilos aumenta relativamente el reemplazo celular en la circulación, sin embargo, se ha observado que la suplementación *in vitro* de Se en cabras selenodeficientes, aumenta los niveles de Se en la sangre, en el suero, en los neutrófilos y en la actividad de GSH-Px, pero en el ganado requiere de días a semanas de suplementación para obtener resultados en la función de los neutrófilos (Swecker 1997).

## **DISTRIBUCIÓN Y APLICACIÓN DEL SELENIO**

El Se está distribuido ampliamente en el ambiente (agua, sólidos, aire) aunque en bajas concentraciones ( $<1\mu\text{g/g}$ ); no obstante, el Se que se encuentra en los alimentos es el reflejo del contenido de Se en el suelo. El Se generalmente se encuentra en el norte y sur de América, en Canadá, en México, en Colombia, en Australia, en Nueva Zelanda, en Bulgaria, en Alemania y en el Mediterráneo. Se han reportado concentraciones más elevadas en el canal de Colorado o en el agua subterránea de la región de Orks (Bem 1981; Smith, Hogan *et al.* 1997; Swecker 1997).

El Se es un elemento que ha tenido múltiples aplicaciones tecnológicas; en electrónica, para producir semiconductores, rectificadores y fotocélulas, en la maquinaria industrial, para obtener elevados grados de acero, en las industrias químicas y de vidrio, como catalizadores, en la industria de caucho, para elevar la vulcanización, en farmacias, para preparar tratamientos veterinarios para enfermedades por deficiencia y en la agricultura, donde se usan los compuestos organoselenados como bactericidas, fungicidas y herbicidas (Bem 1981).

### **ADMINISTRACIÓN RECOMENDADA EN LA DIETA**

La regularización actual de la NRC (feb-2003) pública que toda dieta de los rumiantes, se debe suplementar con 0.3 ppm en forma de selenito de sodio o selenato, (usando dosis por debajo de los niveles tóxicos para crianza, además como profiláctico y terapéutico) ya que existen pocos datos que demuestran que exceder 0.3 ppm puede provocar una mejora adicional en la defensa del hospedador principalmente contra mastitis. Además existen otros factores dietéticos que pueden interferir con la absorción de Se por el tracto digestivo, tales como sulfato, nitratos y elevados niveles de Ca en la dieta (Smith, Hogan *et al.* 1997; Pehrson, Ortman *et al.* 1999).

La concentración máxima permitida en el agua y en residuos de líquidos establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 10  $\mu\text{g/l}$ . Las concentraciones de 5  $\mu\text{g Se/g}$  en alimento y 5  $\mu\text{g Se/g}$  en la leche y en el agua causan daño potencial en los humanos, mientras que los niveles de 2-10 mg/Kg dan lugar a una toxicidad crónica (Weiss 2003).

En rumiantes, los niveles debajo de 50  $\mu\text{g/L}$  en sangre total indican un estado de deficiencia; concentraciones de 50-75  $\mu\text{g/L}$  en sangre se consideran marginales, pero otros autores consideran que por lo menos 100  $\mu\text{g/L}$  en sangre total son requeridas para la fertilidad y para tener una capacidad inmune óptima, incluso recomiendan 200  $\mu\text{g/L}$  para resistir a infecciones tales como mastitis, siendo el equivalente inferior de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  y superior de 0.7  $\mu\text{g/ml}$  en el plasma (Pehrson, Ortman *et al.* 1999).

El coeficiente de variación entre los laboratorios reporta rangos desde 4 a 55% en los niveles del Se en suero y sangre, que se pueden usar para evaluar el estado de Se en ganado, estas variaciones son elevadas si existen menores concentraciones de Se. Cuadro 3

**Cuadro 3. Evaluación del estado de Se en ganado alimentado con selenito**

Estado	Suero o plasma (ppb)	Sangre (ppb)	Hígado (ppb/peso)
<b>Deficiente</b>			20-170
<b>Marginal</b>	20-60	40-150	120-250
<b>Adecuado</b>	25-150	160-1200	250-500
<b>Elevado</b>	800-3500	800-2290	750-1250
<b>Toxico</b>		1900-3400	1250- 7000 (crónico) 7000-47000 (agudo)

Tomado de Swecker, W. S. (1997). "Selenium and Immune Function in Cattle" Compend Contin Educ Pract Vet Food Anim: S248-S285.

## VÍA DE ADMINISTRACIÓN DEL SELENIO

Existen varios métodos por los cuales los animales pueden ser suplementados con Se. El método profiláctico más usado en ovejas es el sistema de pastoreo, pero pueden existir riesgo de deficiencia si no se suplementan con mezcla de sales minerales que contenga Se, puesto que los niveles de Se varían en el suelo y en las plantas de ciertas regiones geográficas. El Se administra frecuentemente por vía oral: en bolo o introduciendo el compuesto en forma de levadura de Se (Sel-Plex<sup>TM</sup>), mezclado con glucosa, agregado a raciones de suplemento, o mezclado en sales minerales. Otra forma por la cual las ovejas obtienen Se es por vía parenteral con sales de Se, liberando rápidamente selenito de Na y K o selenato y /o liberación lenta de selenato de Bario. Varios productos se han usado por diferentes métodos en borregas, proporcionando buena protección por deficiencia de Se, por lo tanto la selección de un adecuado programa de prevención depende del método usado y del grado de deficiencia, dado que las diferentes preparaciones farmacológicas tienen diferente farmacocinética y

concentraciones de elementos traza (<http://www.nap.edu/catalog/614.html> 1985; Swecker 1997; Weiss 2003).

## METABOLISMO Y ABSORCIÓN DEL SELENIO

Cuando el Se inorgánico (selenito y selenato) es consumido, al absorberse, el selenato probablemente se reduce a selenito y entonces, por una serie de reacciones se reduce a selénido. Cuando la Seleniometionina (SeMet) es consumida, se reduce a selénido y se usa para la síntesis de Seleniocisteína (SeCys). Alternativamente, la SeMet puede permanecer intacta y ser usada en la síntesis proteica. No se ha identificado algún ARN<sub>t</sub> específico para la SeMet y al parecer no existe discriminación entre la metionina y la SeMet. La forma activa del Se en las Selenoenzimas es la SeCys, usado en el sitio activo de las Selenoenzimas que son producidas durante el transporte de proteínas. El grupo OH de una molécula serina se liga a un ARN<sub>t</sub> específico (codón UGA) se induce con una mitad de selenol (formando SeCys-ARN<sub>t</sub>) el cual se inserta entonces durante la síntesis de selenoenzimas. El Se dietético no toma en cuenta la forma de consumo, debido a que primero es convertido a selénido inorgánico, que se usa para sintetizar la SeCys bioactiva (Koenig, Rode *et al.* 1997; Weiss 2003).

El tipo de alimento consumido, y el uso de diferentes técnicas para medir la absorción de Se pueden influir en los valores. Solo un 50-90% del Se en la dieta se absorbe, por lo tanto, la absorción en rumiantes tiende a ser baja. Sin embargo, el selenito es reducido más rápidamente dentro del rumen que el Se orgánico (levadura de Se). La SeMet es mejor absorbida en los humanos y borregos, aparentemente esta vía tiene el mismo mecanismo que la metionina. El metabolismo del Se en la dieta se complica por la fisiología y bioquímica del reticulorumen. Aunque las bacterias del rumen son capaces de sintetizar tanto la SeMet como la SeCys de fuentes inorgánicas del Se, la condición en el rumen puede reducir la SeO<sub>3</sub> a Se metálico, lo cual lo hace no disponible para los microbios o animales (Knowles, Grace *et al.* 1999).

## IMPORTANCIA Y BENEFICIO DEL SELENIO

A pesar de que el Se ha sido ampliamente reconocido como un nutriente esencial, la evaluación de su mérito continua. El Se es administrado por varias rutas y en diferentes formas químicas que conducen a diferentes respuestas absolutamente fisiológicas: beneficia la producción de leche y mejora el desempeño reproductivo (movilidad de los espermias y puede reducir el riesgo de que se pierdan). Un aumento en la ingestión de Se puede aligerar condiciones patológicas incluyendo el estrés oxidativo, la inflamación y es el nutriente clave en el control del desarrollo de la virulencia e inhibición del progreso del VIH a SIDA. La deficiencia de Se ha sido asociada a estados de humor alterado y puede ser un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Knowles, Grace *et al.* 1999).

Para optimizar el rendimiento de vacas de alta producción, el estrés oxidativo debe ser controlado con suplementos de nutrientes conocidos como antioxidantes para minimizar los efectos de sustancias que estimulan las ROS, tal es el caso del Sel-Plex® (Se orgánico), que puede reducir el estrés oxidativo causado por exposición al calor y que mantiene el sistema de defensa antioxidante más eficiente (Céspedes y Sánchez 2000; Mahmoud and Edens 2003).

El manejo de programas y el cuidado de la salud consideran al Se requisito para maximizar la eficiencia y la productividad (Bull 2000). Un programa de nutrición apropiado puede ser efectivo solo si los animales son saludables, así los animales alimentados apropiadamente resisten a muchas infecciones bacterianas y parasitarias debido a una mejor integridad de los tejidos corporales, más producción de anticuerpos, mayor inmunidad a enfermedades, aumento de la regeneración sanguínea y otros factores (Thurnham 1997), pero según Spears (2000) la deficiencia de Se no afecta la habilidad de los neutrófilos sanguíneos para ingerir levaduras o bacterias.

Un factor importante de todos los experimentos inmunológicos y clínicos es el mayor control de las dietas consideradas deficientes de Se y de las dietas suplementadas que contienen generalmente entre 0.1-0.3 ppm de Se. De esta manera, al suplementar Se, la producción de una respuesta no ha sido significativa o es ligeramente positiva para el ganado de carne y la producción láctea rara vez aumenta cuando los animales carentes de Se son suplementados. Si bien la producción de una respuesta puede no producir beneficios clínicos o es rara vez observable cuando se suplementan (mejora la salud animal). Investigaciones recientes en ganado lechero y de engorda han mostrado las siguientes respuestas clínicas al suplementar las dietas deficientes: reduce la prevalencia de membranas fetales retenidas, disminuye la prevalencia y la severidad de mastitis clínica, disminuye el conteo de células somáticas y disminuye la mortalidad de becerros (Smith, Hogan *et al.* 1997; Pehrson, Ortman *et al.* 1999; Weiss 2003)

## **EL SELENIO Y LA VITAMINA E**

Tanto el Se como la vitamina E son incluidos en el sistema de defensa celular antioxidante. La vit. E es el antioxidante liposoluble más importante en distintas funciones en el organismo. Se inserta en las membranas lipídicas y las protege contra el ataque de los radicales O<sub>2</sub>. La función mejor conocida de la vit. E es su actividad antioxidante, que contribuye a estabilizar los ácidos grasos sensibles y la oxidación en el metabolismo celular. La peroxidación de lípidos catalizada por radicales libres es un proceso biológico continuo que causa lesiones en las estructuras celulares (Weber 1995).

Por lo que se refiere al sistema inmunitario, las células del sistema inmune y los fagocitos, que proliferan rápidamente tras una estimulación, son particularmente susceptibles a lesiones causadas por radicales libres, peróxidos y superóxidos. Por ende, el papel central de la vit. E en la mejora de la respuesta inmune y en la fagocitosis, es la prevención de la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares; también parece participar en la conversión

de ácido araquidónico a prostaglandinas, compuestos que juegan un importante papel regulador en los procesos biológicos, incluyendo la respuesta inmune y en los últimos años se ha prestado especial atención a su influencia a nivel reproductivo, en la transferencia a las crías y al efecto estabilizador de los procesos oxidativos de la carne (Weber 1995).

EL Se es un micronutriente esencial presente en los tejidos corporales. La función del Se como componente esencial de la enzima GSH-Px, la cual destruye H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos de lípidos, además de que en conjunto con la vitamina E, provoca un aumento sinérgico de la respuesta inmune (importante en la defensa de células y tejidos) y en la resistencia a enfermedades (Spears 2000; Paschoal, Zanetti *et al.* 2003).

El Se y la vit. E tienen una gran influencia en el organismo de hembras suplementadas y de sus crías; para confirmar lo dicho Awadeh demostró que la mezcla de minerales que contienen 120 ppm de Se provoca un aumento de IgG en el calostro de las hembras suplementadas y en el plasma de las crías, pero las concentraciones de IgM no difieren en los animales no suplementados. El inyectar vit. E y Se previo al parto, provoca una mayor producción de calostro y por ende aumenta la concentración de IgM en éste y en el suero de las crías, influyendo en la transferencia de Ig a la progenie (Weber 1995; Awadeh, Abdelrahman *et al.* 1998).

Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que existe un cierto sinergismo cuando ambos factores, vit. E y el Se, están presentes en concentraciones adecuadas en el alimento, incrementando la función de los PMN y su capacidad para eliminar bacterias y/o levaduras. En cuanto a la deficiencia tienen una influencia notable en la respuesta humoral, disminuyen el peso de la bolsa de Fabricio, reducen el número total de linfocitos en los órganos linfoides primarios y en el bazo y producen cambios histológicos en éstos tejidos, entre otros trastornos (Morgante, Beghelli *et al.* 1999; Spears 2000; Paape, Mehrzad *et al.* 2002).

## TRASTORNOS PROVOCADOS POR DEFICIENCIA DE SELENIO

En publicaciones hechas alrededor de los últimos 10 años, se han identificado en ovejas la aparición de algunos problemas reproductivos sobretodo en el periodo seco (mastitis, placenta retenida, metritis, ovarios quísticos), enfermedades periodontales, degeneración muscular y alteración en la síntesis de hormonas esteroidales y prostanglandinas, causadas principalmente por cantidades inadecuadas de vit. E y Se; para evitar dichos problemas la cantidad que se debe agregar en el alimento debe estar por encima de lo necesario (incluyendo elevados márgenes de seguridad en los correctores vitamínicos y minerales, teniendo siempre en cuenta que las dosis muy elevadas de algunos de ellos pueden ser tóxicas) (<http://www.nap.edu/catalog/614.html> 1985; Weber 1995; Serdaru, Vladescu *et al.* 2004).

En muchos casos, existe un desconocimiento de las necesidades de una vitamina o mineral determinado para una función concreta, originando nuevas técnicas analíticas que facilitan la medición de estos nutrientes, de sus formas activas y sus metabolitos, así como de su influencia sobre algunas funciones fisiológicas y sobre la calidad del producto final. A ello hay que añadir, en algunos casos, la aparición de nuevas formas de suplementación de una vitamina o micromineral determinado, para emplearla en peces, aves, cerdos, ovinos y vacunos, y asimismo establecer su eficacia para mantener un alto nivel de protección inmunitaria frente al estrés e infecciones que pueden ocurrir en condiciones prácticas de la producción animal moderna (Weber 1995; Piquer 2000).

## COMPARANDO FUENTES DE SELENIO

Aún no se han encontrado datos que demuestren que suplementar cantidades adicionales a 0.3 mg/kg tenga algún efecto benéfico cuando los antagonistas dietéticos no se presentan. Por mucho tiempo, solo el selenito y el

selenato de sodio (Se inorgánico) se usaron como fuente de suplementación en ganado lechero y de engorda, incluso se han obtenido datos que hablan acerca de suplementar dietas de los animales con selenito de Na cuando se espera un déficit tanto en la salud como en su productividad. Sin embargo ahora también se aprovecha la levadura de Se (orgánico) y se incluye en la dieta en forma de Sel-Plex™, comparándolo recientemente con el Se inorgánico; de esta manera, los estudios clínicos (efecto de la fuente de Se en la retención de membranas fetales) son el mejor camino para comparar dichas fuentes, pero resulta costoso por el gran número de animales utilizados y la larga duración. Existen otros métodos para analizar las concentraciones de Se en sangre total, en plasma, en leche, en varios tejidos, incluso de medir la actividad de la selenoenzima GSH-Px en sangre total. Sin embargo algunas diferencias pueden o no corresponder a diferentes respuestas clínicas (McIntosh and Royle, 2002; Weiss, 2003).

## **SE INORGÁNICO VS SE ORGÁNICO**

Desde 1980, el suplemento comercial para alimentar animales de granja ha sido en forma de selenito de Na. La mayoría de los estudios proponen que los animales deben consumir 4-10mg de Se/d cuando el selenato o el selenito es la fuente principal. Al usar selenato de Na en ovejas, se aumenta la concentración de Se en los tejidos en un 30% más que con el selenito, aunque al tratarse de vacas y vaquillas hay una ligera diferencia entre el selenito y el selenato, sobre todo si se basa en la actividad de la GSH-Px, en concentraciones sanguíneas y lácteas de Se. En el metabolismo el selenato se convierte en selenito en el rumen por lo que hay poca diferencia (Ortman and Pehrson 1999).

En cambio, la actividad de la GSH-Px en sangre total con levadura de Se, es mayor en vacas lecheras al ser comparada con la del selenito. El camino del Se metabolizado se explica por las diferentes respuestas al comparar la levadura y el selenito (causando gran diferencia de las concentraciones en leche, al compararse con pequeñas diferencias de Se en sangre total y en la

actividad de la GSH-Px). La actividad de GSH-Px en sangre total es un índice aprovechable del seleniuro inorgánico concentrado en el cuerpo. El Se en sangre total incluye al Se en la GSH-Px y otras selenoproteínas específicas, algunos tipos de Se inorgánicos y Se en SeMet. Si se consume SeMet, ésta se puede encontrar en más proteínas sanguíneas y en el plasma unido a la metionina, es transportado a los tejidos (Weiss 2003).

Varias investigaciones han demostrado que el selenito y selenato son igualmente aprovechados por las ovejas, de tal forma que las características pro-oxidativas del selenito carecen de efectos negativos en animales, porque las dos sustancias siguen un camino metabólico similar después de ser absorbidas por el tracto digestivo, esperando que el selenato se reduzca a selenito por microorganismos ruminales y el Se inorgánico pueda ser parte de la reducción a elementos inobtenibles en el rumen. Se ha señalado que los antioxidantes en el alimento son parcialmente destruidos durante el almacenamiento por la presencia de sustancias oxidativas. Es posible que la presencia del selenito en el alimento comercial pueda tener un efecto deteriorante al agregar otras sustancias (vit. E), esta es una razón por la cual el selenato puede ser preferible como suplemento alimenticio (Ortman and Pehrson 1999).

El Sel-Plex es un producto de levadura selenizada que proporciona Se orgánico en forma de selenoaminoácidos, encontrado en las plantas y granos, tiene un 20% de actividad en la GSH-Px (principalmente como L-seleniometionina) considerándose más segura y efectiva en la dieta, siendo la SeMet es una forma de suplementar animales y humanos ya que el Se esta presente en los alimentos y se almacena en las proteínas corporales (McIntosh and Royle 2002; Mahmoud and Edens 2003).

Los rumiantes suplementados con levadura siempre tienen mayor concentración de Se en leche, mejor retención corporal de Se y también aumenta la concentración de Se en sangre total, aumentando la SeMet en la

circulación (en cualquier proteína o aminoácido libre) si la circulación esta libre de SeMet se puede remplazar en el tejido durante la síntesis proteica. Además, recientemente se ha demostrado el potencial de la levadura de Se en humanos como agente cancerígeno en niveles supranutricionales (200µg Se) (Pehrson, Ortman et al. 1999; McIntosh and Royle 2002; Weiss 2003).

## EFFECTO DEL SELENIO SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS

El estado nutricional de los animales se ha asociado con la capacidad de resistir a infecciones, pero durante el periparto disminuyen los niveles sanguíneos de Ca, Se, Zn, Mg, P, K (Weber 1995).

Al evaluar la función de los PMN en animales selenodeficientes, se revela un posible incremento en enfermedades infecciosas, un aumento en la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una disminución de la concentración de enzimas bactericidas mieloperoxidasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida. La disminución de dicha actividad bactericida (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*) en neutrófilos selenodeficientes, se ha ligado a la producción de radicales oxigenotóxicos, que disminuyen la viabilidad y reducen la capacidad de muerte intracelular de patógenos (Weber 1995; Smith, Hogan et al. 1997; Weiss 2003).

La acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los PMN se asocia con una disminución en la muerte intracelular de patógenos y la vit. E y el Se reducen este efecto lateral, de hecho el Se junto con la vit. E, comparten el papel de antioxidantes y neutraliza parcialmente el efecto negativo de las ROS (Morgante, Beghelli et al. 1999; Paape, Mehrzad et al. 2002).

## **HIPÓTESIS**

Al suplementar ovejas en forma oral con Se orgánico se obtiene una mejoría en los niveles de leucocitos, particularmente neutrófilos

## **OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo es determinar los números de leucocitos totales y de neutrófilos en sangre de ovejas jóvenes nulíparas suplementadas con 2 ppm/d de Se orgánico durante 2 meses.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento se realizó en los meses de julio a septiembre del 2005 en la explotación ovina de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna (UAAAN-UL), localizada en Periférico y Carretera a Santa Fe, en la Comarca Lagunera de Coahuila (26° Latitud Norte, 104° Longitud Oeste). Esta región esta situada a una altitud de 1123 msnm, tiene clima seco y extremoso con lluvias en verano (precipitación pluvial promedio de 223 mm por año). Las variaciones fotoperiódicas de esta región son de 13 horas 41 minutos de luz en el solsticio de verano a 10 horas 19 minutos de luz en el solsticio de invierno, las temperaturas oscilan entre -3° C en invierno y 40° C en verano.

### GRUPOS EXPERIMENTALES

En este estudio se utilizaron 10 borregas, distribuidas en forma aleatoria en dos grupos, en los que recibieron uno de los siguientes tratamientos:

Primer grupo (n=5) con peso promedio de 39 kg, suplementadas con Se orgánico (2.0 mg diarios, del producto de la levadura de Se [Sel-Plex® Lab. Altech de México]) en la dieta, El cual para proporcionarse mas fácilmente se preparó de la siguiente manera: 0.2 mg de Se en 100 ml de glucosa al 45%, para administrar 20 ml por vía oral todos los días.

Segundo grupo (n=5) con peso promedio de 39 kg, que fue el grupo control con dieta normal sin suplementación. Se les administró 20 ml de solución glucosada al 45% por día.

Las borregas de los dos grupos fueron ubicadas en jaulas individuales, en donde se les proporcionó sombra y agua a libre acceso y una dieta de heno de alfalfa (14.6% de P.C., 1.14 Mcal Kg. Enm) y concentrado de maíz (8.1% de P.C. y 1.62 Mca. Kg. Enm) durante todo el período experimental.

La administración del suplemento y de la glucosa para ambos grupos se realizó por las tardes, todos los días.

## **TOMA DE MUESTRAS**

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos Vacutainer\* con EDTA como anticoagulante, a las 10 ovejas a los 15 días del mes de Julio, el 1 y 15 días de Agosto, y 1 y 15 días del mes de septiembre, para realizar las pruebas de: Cuenta total de leucocitos sanguíneos y Cuenta diferencial para reconocer el número de neutrófilos. Los resultados fueron analizados estadísticamente por el método de ANOVA en los meses de octubre-diciembre.

## **EQUIPO**

Microscopio de luz LABOMED, Modelo CX, guantes y torundas de algodón estériles, jeringas de 5ml y tubos Vacutainer con EDTA® para muestras de sangre.

Para la determinación del número de leucocitos/ ml se utilizó la cámara de cuenta de glóbulos Neubauer y cubrehematímetro Hausser Scientific, boquilla con manguera de hule, pipeta de dilución de Thoma, agitador mecánico para pipetas.

Para la determinación de la cuenta diferencial en frotis sanguíneo de sangre periférica se utilizaron portaobjetos 25 x 75 mm seleccionados para microscopios marca Madesa.

## **SOLUCIONES**

Solución diluyente de sangre para cuenta de leucocitos, Golden Bell (líquido de Turk)

Juego de colorantes Hemocrom para tinción policroma rápida de frotis sanguíneos: por sus características, sustituye al Wright Alcohol metílico JT Baker grado analítico.

## METODOLOGÍA

### TÉCNICA PARA LA CUENTA TOTAL DE LEUCOCITOS SANGUÍNEOS

Para determinar el número de leucocitos totales /ml de sangre, se tomaron 4 ml de sangre de la vena yugular, de cada una de las borregas con jeringas estériles y se depositaron en tubos Vacutainer con EDTA®, para ser analizadas en el laboratorio con el siguiente procedimiento: se coloca la boquilla con la manguera de hule en la pipeta de dilución de Thoma para que esta sea sumergida dentro del tubo Vacutainer con EDTA® que contenía la sangre, posteriormente se succiona la sangre lentamente hasta llegar a la marca 0.5 ml de la pipeta, se limpia la superficie externa de la pipeta con una torunda de algodón, con la mano derecha se introduce la pipeta en el frasco del diluyente el cual se debe sostener con la mano izquierda y se succiona, así podemos ver que el líquido de Turk llega hasta la marca 11.0, obteniendo una dilución sanguínea final de 1:20. Se retira la boquilla, para colocar la pipeta en el agitador mecánico para pipetas por dos minutos. Posteriormente se lleva a cabo el montaje colocando el cubrehematímetro sobre la cámara de cuenta de glóbulos Neubauer, desperdiciando las primeras 3-4 gotas de sangre sobre una torunda, antes de cargar la cámara (poniendo la punta de la pipeta en el borde de la cámara, se controla el flujo con el dedo índice permitiendo que una pequeña porción cubra completamente el área), luego se observó con el objetivo 10x en el microscopio para hacer el cálculo de leucocitos totales en los 4 cuadrantes exteriores (Número contado x 50= leu/mm<sup>3</sup>). La cámara no se lava con escobillón, sino con los dedos o con una gasa con detergente, esto se hace antes y después de usarla.

## **TÉCNICA PARA LA CUENTA DIFERENCIAL EN FROTIS SANGUÍNEO**

Para determinar la cuenta diferencial en frotis sanguíneo de sangre periférica realizamos lo siguiente: se mezcló completamente la sangre, invirtiendo el tubo Vacutainer 10-12 veces y se removió el tapón. Se introdujo el aplicador dentro del tubo, después se tocó con éste el portaobjetos para adherir una gota pequeña de sangre, con la mano izquierda se sostiene el portaobjetos y con la derecha se toma una laminilla que servirá como deslizadora, que va sobre el portaobjetos en un ángulo de 30-45 ° de forma tal que la sangre se extienda con uniformidad a lo largo del ángulo agudo formado por las dos laminillas, luego se baña con alcohol metílico y se deja secar. Tomando en cuenta que el extendido de sangre se hace en 1 h máxima después de tomada la muestra.

La Técnica de Tinción. Consiste en cubrir la laminilla con Wright de la siguiente manera: Se coloca la laminilla por 30 seg. en el reactivo No. 1 base de Eosina Amarillenta ajustada a un pH 6.4, luego por 30 seg. en el reactivo No. 2 solución amortiguadoras de fosfatos, ajustada a un pH de 7.2, luego por 30 seg. en el reactivo No. 3 solución colorante estable a base de Azul de Metileno, Azures y Giemsa en solución ajustada a pH 6.4. Después de este proceso de tinción se lava la laminilla con agua del grifo o destilada hasta que la extensión presente una coloración rosa pálido y se fija con etanol. Una vez seca la laminilla se coloca sobre esta un cubreobjetos para llevarla al microscopio y contar 100 células, siguiendo la técnica de zig-zag de Shilling donde los resultados se expresan en porcentajes.

## **MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Para la interpretación de los resultados obtenidos se usó el método de análisis estadísticos "ANOVA" para determinar el nivel de significancia que se obtuvieron en el experimento al comparar grupos, uno con otro o entre miembros de un mismo grupo.

## RESULTADOS

### RESULTADOS DE LA CUENTA TOTAL DE LEUCOCITOS SANGUÍNEOS

Los resultados de la cuenta total de Leucocitos sanguíneos son reportados en el Cuadro 4. Estos resultados no muestran una diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre el grupo suplementado y el grupo testigo (9583.02 vs 1056.98 leucocitos/  $\mu$ l), sin embargo, se encuentran dentro de los límites aceptados para animales sanos. Los parámetros son reportados de acuerdo al periodo de muestreo, donde se muestran las cantidades de leucocitos sanguíneos de ambos grupos en cada fecha.

*Cuadro 4. LSMEANS de Leucocitos Totales (ml) en sangre de ovejas suplementadas (n=5) con Selenio orgánico (0.2 mg/d) y en ovejas sin suplemento (n=5) de Selenio orgánico*

Variable	Selenio	Testigo	EE <sup>1</sup>	NSO <sup>2</sup>
Leucocitos totales 1	9583.02	10656.98	704.81	0.32
Leucocitos totales 2	9767.74	8659.06	670.25	0.29
Leucocitos totales 3	10155.41	9759.59	1609.54	0.87
Leucocitos totales 4	9008.90	10538.87	973.86	0.27

EE <sup>1</sup> = Error estadístico,

NSO <sup>2</sup> = Nivel de Significancia Observada

1,2,3,4= Fecha de muestreo

## RESULTADOS DE LA CUENTA DIFERENCIAL EN FROTIS SANGUÍNEO

Los resultados de la cuenta total de Neutrófilos sanguíneos son reportados en el Cuadro 5. Estos resultados no muestran una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre el grupo suplementado y el grupo testigo, aunque en ambos grupos se encuentran dentro de los límites normales (32.79 vs 21.41/ $\mu\text{l}$ ). Dichos parámetros son reportados de acuerdo al periodo de muestreo. Donde se muestran las cantidades de Neutrófilos sanguíneos de ambos grupos en cada fecha

*Cuadro 5. LSMEANS de Neutrófilos Totales (ml) en sangre de ovejas suplementadas (n=5) con Selenio orgánico (0.2 mg/d) y en ovejas sin suplemento (n=5) de Selenio orgánico*

Variable	Selenio	Testigo	EE <sup>1</sup>	NSO <sup>2</sup>
Neutrófilos Totales 1	34.23	27.57	5.27	0.41
Neutrófilos Totales 2	29.75	34.45	3.49	0.38
Neutrófilos Totales 3	32.79	21.41	4.31	0.11
Neutrófilos Totales 4	31.92	37.10	2.26	0.21

EE <sup>1</sup> = Error estadístico,

NSO <sup>2</sup> = Nivel de Significancia Observada

1, 2, 3, 4 = Fecha de muestreo

## DISCUSIÓN

Si la suplementación con selenio en la dieta de los animales tiene influencia en la mejora de la respuesta inmune innata, es de esperar que exista un incremento en el número de leucocitos sanguíneos y en particular neutrófilos. Sin embargo, los hallazgos obtenidos en el presente estudio demuestran que las ovejas jóvenes nulíparas no presentan aumento en la cantidad de leucocitos totales ni de polimorfonucleares sanguíneos cuando son suplementadas en forma oral con selenio orgánico (2ppm al día), ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo suplementado con selenio orgánico (Sel Plex®) durante un periodo de 2 meses.

A diferencia de los resultados obtenidos por Meglia (2001) y Morgante (1999) que trabajaron con animales en período de parto, nuestros resultados no demuestran un efecto favorable del selenio al eliminar el factor parto. Es probable que esto se deba a que nuestra población no presentaba inmunosupresión debido a su edad, alimentación y cuidados óptimos, o que haga falta la combinación de Se con la vitamina E.

Varios autores (Mallard, Dekkers *et al.* 1998) han observado que también la función de los leucocitos polimorfonucleares está alterada durante el periodo del parto, lo cual se puede deber a un desequilibrio entre la producción y los dispositivos de eliminación de los radicales libres oxígeno reactivos (Miller, Brzezinska-Slebodzinska *et al.* 1993). Es por ello que el Se, al actuar como antioxidante da evidencia de mejorar la función de los neutrófilos en ese periodo.

## CONCLUSIÓN

La suplementación con selenio orgánico en ovejas jóvenes nulíparas no mejora la cantidad de leucocitos ni de neutrófilos, probablemente debido a que estos se encuentran en situación fisiológica óptima. Por ser el selenio un antioxidante, sus efectos se perciben mejor cuando existe una situación de estrés que provoca una inmunodeficiencia. Se recomienda pues que se estudie la función de los neutrófilos en animales sometidos a otros tipos de estrés, como por ejemplo estrés calórico, para poder tener otros parámetros.

## LITERATURA CITADA

- Abbas, A. A., A. L. Lichtman, et al. (2002). Immunologia celular y molecular. México, McGraw-Hill-Interamericana.
- 2 Arthur, J. R., R. C. McKenzie, et al. (2003). "Selenium in the immune system." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1457S-9S.
- Awadeh, F. T., M. M. Abdelrahman, et al. (1998). "Effect of selenium supplements on the distribution of selenium among serum proteins in cattle." J Dairy Sci **81**(4): 1089-94.
- Awadeh, F. T., R. L. Kincaid, et al. (1998). "Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves." J Anim Sci **76**(4): 1204-15.
- Bem, E. M. (1981). "Determination of selenium in the environment and in biological material." Environ Health Perspect **37**: 183-200.
- Bull, R. C. (2000). Trace Minerals and Immunology. Beef Cattle Handbook BCH-5454.
- Burton, J. L., S. A. Madsen, et al. (2001). "An immunogenomics approach to understanding periparturient immunosuppression and mastitis susceptibility in dairy cows." Acta Vet Scand **42**(3): 407-24.
- Burvenich, C., E. Monfardini, et al. (2004). "Role of neutrophil polymorphonuclear leukocytes during bovine coliform mastitis: physiology or pathology?" Verh K Acad Geneesk Belg **66**(2): 97-150; discussion 150-3.
- Céspedes, C. T. and S. D. Sánchez (2000). "Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación." Rev Cubana Cardiol **14**(1): 55-60.
- 1 Failla, M. L. (2003). "Trace elements and host defense: recent advances and continuing challenges." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1443S-7S.
- Goldsby, R., T. J. Kindt, et al. (2004). Immunologia. M. Hill. Mexico: 5-23. <http://www.nap.edu/catalog/614.html> (1985). Selenium. Nutrient Requirements of Sheep. t. R. Edition, National Academy of Science.
- Humprey, D. B., A. E. Koutsos, et al. (2002). "Requirements and priorities of the immune system for nutrients." Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industrie Proceedings of Altechs 18th Annual Symposium: 69-77.
- Knowles, S. O., N. D. Grace, et al. (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.
- Koenig, K. M., L. M. Rode, et al. (1997). "Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep." J Anim Sci **75**(3): 817-27.

- Madamanchi, N. R., S. Li, et al. (2001). "Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(3): 321-6.
- Mahmoud, K. Z. and F. W. Edens (2003). "Influence of selenium sources on age-related and mild heat stress-related changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*)." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **136**(4): 921-34.
- Mallard, B. A., J. C. Dekkers, et al. (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.
- Martindale, J. L. and N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." J Cell Physiol **192**(1): 1-15.
- McIntosh, G. H. and P. J. Royle (2002). "Supplementation of cows with organic selenium and the identification of selenium-rich protein fractions in milk." In CSIRO Health Science and Nutrition. 18th Annual Symposium: 233-238.
- Meglia, G. E., A. Johannisson, et al. (2001). "Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows." Acta Vet Scand **42**(1): 139-50.
- Miller, J. K., E. Brzezinska-Slebodzinska, et al. (1993). "Oxidative stress, antioxidants, and animal function." J Dairy Sci **76**(9): 2812-23.
- Morgante, M., D. Beghelli, et al. (1999). "Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes." J Dairy Sci **82**(3): 623-31.
- Nambiar, M. P., C. U. Fisher, et al. (2002). "Oxidative stress is involved in the heat stress-induced downregulation of TCR zeta chain expression and TCR/CD3-mediated [Ca(2+)](i) response in human T-lymphocytes." Cell Immunol **215**(2): 151-61.
- Ortman, K. and 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, et al. (2002). "Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(2): 109-21.
- Paape, M. J., D. D. Bannerman, et al. (2003). "The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk." Vet Res **34**(5): 597-627.
- Paschoal, J. J., M. A. Zanetti, et al. (2003). "Suplementação de Selênio e Vitamina E sobre a Contagem de Células Somáticas no Leite de Vacas da Raça Holandesa." R. Bras. Zootec., v. **32**(6): 2032-2039.

- Pehrson, B., K. Ortman, et al. (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.
- Piquer, F. J. (2000). Avances en nutrición y alimentación animal nuevas perspectivas en el uso de oligoelementos y vitaminas en alimentación animal. XIV Curso de Especialización, Pfizer Salud Animal: 1-14.
- Serdaru, M., L. Vladescu, et al. (2004). "Fluorimetric study of the selenium course in the dam-calf relationship." Small Rum. Res. **99**(1-3): 133-22.
- Smith, K. L., J. S. Hogan, et al. (1997). "Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality." J Anim Sci **75**(6): 1659-65.
- Spears, J. W. (2000). "Micronutrients and immune function in cattle." Proc Nutr Soc **59**(4): 587-94.
- Swecker, W. S. (1997). "Selenium and Immune Function in Cattle." Compend Contin Educ Pract Vet — Food Anim: S248-S285.
- Thurnham, D. I. (1997). "Micronutrients and immune function: some recent developments." J Clin Pathol **50**(11): 887-91.
- 3 Weber, G. G. (1995). Micronutrientes e inmunidad. II. Vitaminas." XI Curso de especialización FEDNA.
- 4 Weiss, W. P. (2003). "Selenium nutrition of dairy cows: comparing responses to organic and inorganic selenium forms." Nut Biotechnol Feed Ind **73**: 333-343.