UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
Facultad de Ciencias

Meta-análisis del efecto de la suplementación con Selenio sobre la actividad de la Glutation Peroxidasa en distintas especies y tejidos

Tesina Final de la Licenciatura en Bioquímica

María Laura Alberro Brage

Tutor: Dra. María Cristina Cabrera Bascardal
Co-Tutor: Dr. Ali Saadoun

Montevideo, Enero 2013

RESUMEN

El término Glutatión Peroxidasas (GPx) define una familia de enzimas pertenecientes al sistema antioxidante de organismos aerobios. Dentro de dicha familia se incluyen selenoenzimas que contienen Selenio (Se) en su sitio activo, siendo este mineral elemento fundamental para la eficaz actividad de la enzima. Dada su esencialidad, la suplementación con Se a la dieta de los animales se hizo práctica común en la crianza de distintas especies. En el presente trabajo se realiza un Metanálisis de Medias sobre una búsqueda electrónica en base de datos, complementada con un Análisis de Varianza (ANOVA One Way) para evaluar la tendencia del efecto producido por la suplementación a distintas dosis y fuentes de Se sobre la actividad de las Glutatión Peroxidasas Se-dependientes en distintas especies y tejidos, partiendo de dietas con suplementación basal y deficiente en Se.
Se observó que existe un aumento significativo en la actividad enzimática sólo cuando las dietas iniciales son deficientes en Se. En la mayoría de los casos no se observaron diferencias significativas entre distintas fuentes de Se (orgánico o inorgánico).
Dichas observaciones permitirían concluir que en situaciones de aporte nutricional normal de Se la suplementación dietaria no produciría efecto significativo en la actividad de la GPx.

Laboratorio de Nutrición y Calidad de los Alimentos, Facultad de Agronomía – Facultad de Ciencias.
Laboratorio de Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias.

INTRODUCCIÓN

Especies reactivas, estrés oxidativo y antioxidantes

El oxígeno es fundamental para la eficiente producción de energía en organismos aerobios. Esta esencialidad contrasta con el hecho de que el oxigeno es un elemento capaz de formar especies tóxicas para las células; los organismos aerobios sobreviven sólo porque han desarrollado defensas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2006) (Halliwell, 2006). La reducción secuencial de la molécula de O_2 dentro de las células conduce a la formación de las llamadas especies reactivas de oxígeno, que son en su mayoría **radicales libres**. (González-Torres et al, 2000)

Los radicales libres son moléculas orgánicas e inorgánicas y átomos que contienen uno o más electrones no apareados, con existencia independiente (Halliwell et al, 1994). La formación de los radicales libres en vivo ocurre vía acción catalítica de las enzimas durante los procesos de transferencia de electrones que ocurren en el metabolismo celular y también por exposición a factores exógenos. Estas moléculas son altamente inestables y químicamente muy reactivas (González-Torres et al, 2000) y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas provocando daño a nivel celular y tisular.

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno y sus principales características (González-Torres et al, 2000)

Radical	Nombre	Características
O_2^-	Superóxido	Es muy reactivo en medio hidrofóbico, pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas puede transformarse en peróxido de hidrógeno.
OH·	Hidroxilo	Es el más reactivo y se le ha relacionado con el daño sufrido directamente en el ADN, proteínas y lípidos.
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno	No es un radical, pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos como el hierro y el cobre.
$ONOO^-$	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado directamente con la patología de varios desórdenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer.
$^1O_2$	Oxígeno simple	Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido durante la lipo peroxidación. Juega un papel importante en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y desórdenes degenerativos.

Los **antioxidantes** se definen como cualquier sustancia que cuando está presente a concentraciones bajas comparadas con las del sustrato oxidable, inhibe o retrasa significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1989). La definición incluye compuestos de naturaleza enzimática y no enzimática. (Sies, 1995) (Sies, 1997)
En organismos aerobios la producción de especies reactivas está equilibrada con el sistema de defensa antioxidante. Continuamente ocurren daños mediados por estas especies por lo que las defensas antioxidantes controlan los niveles de especies reactivas en lugar de eliminarlas (Halliwell, 2007).

El término **estrés oxidativo** se refiere a un serio desequilibrio entre la producción de las especies reactivas y las defensas antioxidantes. Ha sido definido como una alteración en el equilibrio pro-oxidantes/antioxidantes a favor de los primeros, llevando a un daño potencial. (Sies, 1991) (Halliwell, 2007) Este daño es llamado "daño oxidativo" y se define como el daño biomolecular causado por el ataque de especies reactivas sobre los constituyentes de organismos vivientes. (Halliwell y Whiteman, 2004) (Halliwell, 2007). Los objetivos celulares frecuentemente atacados son el ADN, proteínas y carbohidratos y lípidos membranales.

La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones en la permeabilidad o la pérdida de integridad de la membrana plasmática y la de los organelos celulares. (Saran et al, 1990). Los ácidos grasos poli-insaturados que predominantemente se ubican en las membranas celulares, son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres.
(Halliwell, 1989) El radical hidroxilo (OH·) tiene la habilidad de estimular la reacción en cadena de radicales libres conocida como lipo peroxidación. Esto ocurre cuando el OH· es generado cerca de las membranas, atacando las cadenas laterales de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana. Las cadenas laterales con varios dobles enlaces son más susceptibles al ataque. El OH· extrae un átomo de hidrógeno de su enlace con un átomo de carbono en la cadena lateral y se combina para formar agua, dejando atrás un radical lipídico el que puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo (R-OO·). Éste puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando más radicales lipídicos, mientras él mismo se trasforma en un hidroperóxido (R-OOH), el que en

presencia de varios complejos metálicos puede descomponerse en más radicales incluyendo entre ellos al radical hidroxilo, provocando la expansión del daño. (González-Torres et al, 2000) (Halliwell, 1989)

(1) $RH + \text{Radicales libres} \longrightarrow R\bullet$
(2) $R\bullet + O_2 \longrightarrow ROO\bullet$
(3) $ROO\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R\bullet$
(4) $ROOH + Fe^{2+} \longrightarrow ROO\bullet + OH\bullet$

Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación. (González-Torres et al, 2000) RH: Acido graso poli-insaturado; R•: Radical lipídico; ROO•: Radical peroxilo; ROOH: Radical hidroperóxido; OH•:Radical hidroxilo.

Por lo tanto un OH· puede resultar en la conversión de muchos cientos de cadenas laterales de ácidos grasos en lipo hidroperóxidos. La acumulación de éstos en una membrana trastorna su funcionamiento y puede causar su colapso. Los lipo hidroperóxidos también pueden descomponerse para formar un rango de productos altamente citotóxicos como por ejemplo los aldehídos. (Halliwell, 1989) Además, la lipoperoxidación no sólo daña a las membranas si no también pueden causar daños a las proteínas membranales, inactivando receptores o enzimas unidas a las membranas, teniendo también efecto adverso sobre lipoproteínas plasmáticas. (Dean et al, 1986) (Girotti, 1998)

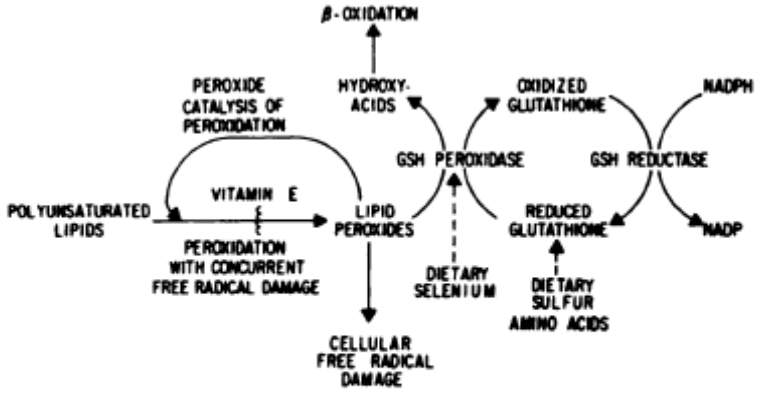


Figura 1. Función del selenio en el sistema Glutation Peroxidasa en la inhibición del daño causado por la lipoperoxidación. (Omaye et al, 1974)

Como fue mencionado anteriormente las células presentan **mecanismos de protección a distintos niveles**, de modo que los radicales libres derivados de la activación de oxígeno pueden ser trasformados a productos menos tóxicos o no tóxicos. Esta protección comprende no sólo la captura de estos intermediarios agresivos, si no también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones. (González-Torres et al, 2000) (Sies, 1997)

Una primera línea de defensa contra las especies reactivas del oxígeno es la prevención, o sea la protección contra su formación. Hay numerosas estrategias. Algunas de las enzimas que son propensas a generar radicales libres están diseñadas ingeniosamente de modo que mantienen los radicales formados dentro de cierto espacio no permitiendo su diseminación a los alrededores (ej. Ribonucleósido reductasa). También la prevención de la iniciación de la reacción en cadena incluye la unión a iones metálicos, en particular hierro y cobre. La quelación metálica es una de las maneras principales para controlar la lipo

peroxidación y la fragmentación del ADN. Así mismo las proteínas de unión a metales como la ferritina, transferrina, ceruloplasmina y otras, son de gran importancia en el control de las reacciones que generan radicales libres.

En un segundo nivel de protección está la acción de los antioxidantes, que eliminan los radicales para suprimir la actividad nociva en la célula. Estos pueden dividirse en dos categorías: no enzimáticos y enzimáticos.

Antioxidantes no enzimáticos: El problema básico es interceptar una especie dañina una vez que está formada para prevenir futuras reacciones deletéreas. Este es el proceso de desactivación, y consiste en la formación de no radicales y de productos finales no reactivos.
Un segundo objetivo es trasferir la función radical lejos de los sitios más sensibles hacia compartimientos de la célula donde el daño oxidativo será menos deletéreo. En general esto significa trasferir equivalentes oxidativos desde las fases hidrofóbicas a acuosas. Los antioxidantes más eficientes en este sentido son aquellos que combinan propiedades óptimas para ambos objetivos. Tales antioxidantes que rompen la reacción en cadena son comúnmente compuestos fenólicos. Entre estos antioxidantes están la vitamina A, E (α-tocoferol), C, carotenoides, glutatión, ácido úrico, etc. Son antioxidantes de ruptura de cadena que previenen y restringen la formación y propagación de la reacción en cadena. α-tocoferol es probablemente el más eficiente en la fase lipídica.
Un pre requisito para una intercepción eficiente por los antioxidantes fenólicos es que la vida media del radical a ser interceptado no sea muy corta.

Antioxidantes enzimáticos: Todas las células en organismos eucarióticos contienen enzimas antioxidantes poderosas. Las tres clases principales de enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y glutatión peroxidasas (GPx) (Código de nomenclatura enzimática: [EC 1.11.1.9]).

La SOD es una familia de metaloenzimas que contienen cobre y zinc que cataliza el cambio del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, en una reacción en la que dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos diferentes (dismutación), una se oxida y otra se reduce:

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

La Catalasa contiene un grupo hemo unido a su sitio activo. Su actividad se localiza básicamente en los peroxisomas donde cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

La Glutatión peroxidasa es una enzima que utiliza como cofactor al selenio. Cataliza la reacción a través de la cual el glutatión reducido (GSH) reacciona con peróxidos para trasformarlos en agua y alcohol. Durante el proceso el glutatión es oxidado (GSSG) para posteriormente ser regresado a su estado original por la enzima glutatión reductasa.

$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

Como los procesos de prevención e intercepción no son completamente efectivos, los productos del daño oxidativo son continuamente producidos a bajas tasas y por consiguiente se pueden acumular. Esto causa daños al ADN, a las membranas, a proteínas y otros compuestos. Por lo tanto hay múltiples sistemas enzimáticos involucrados en reparación del ADN y enzimas lipolíticas y proteolíticas capaces de cumplir las funciones de reparación o re abastecimiento. En esto consiste el tercer nivel de protección de la célula frente a ataques de especies reactivas.

Adicionalmente existen numerosas enzimas antioxidantes especializadas que reaccionan con y en general detoxifican compuestos oxidantes. Funciones antioxidantes indirectas llevadas a cabo por enzimas son: a) función de respaldo, por ej. reabastecimiento de glutatión reducido (GSH) desde su forma oxidada (GSSG) por la flavoproteína GSSG reductasa; y b) el trasporte y eliminación de compuestos reactivos, por ej. la Glutatión-S-transferasas y los sistemas de trasporte para conjugados S-Glutatión.

Existe **interacción** entre los distintos niveles de defensa. Por ejemplo, la vitamina E (Toc-OH) reacciona con los radicales peroxiles (ROO·) según la siguiente reacción:

$$ROO\cdot + Toc\text{-}OH \longrightarrow ROOH + Toc\text{-}O\cdot$$

El radical tocoperoxil puede retornar luego a su forma activa tocoferol mediante reacciones de reciclado con otros antioxidantes como el ácido ascórbico, glutatión, carotenoides y ubiquinol (Surai, 1999b).
El segundo producto de la acción antioxidante de la vitamina E es un hidroperóxido. Éstos son sustancias tóxicas y deben ser removidos de la célula de la misma forma que el H_2O_2, pero la Catalasa no puede reaccionar con estos compuestos. Solamente la GPx dependiente de Se puede convertir estos compuestos en productos no reactivos (Flohé, 1999):

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{\text{Se-GPx}} ROH + GSSG + ROH$$

Por lo expuesto la segunda parte del proceso de remoción de radicales libres mediado por la vitamina E depende de la actividad de la GPx.

Glutatión Peroxidasa en sistemas biológicos

La familia de enzimas conocidas como Glutatión Peroxidasas (GPx's) son hidroperoxidasas cuya función es proteger el cuerpo de estos peróxidos dañinos (Arthur, 2000). La misión principal de estas enzimas es catalizar la reacción que remueve el peróxido de hidrógeno vía el glutatión reducido.
La reacción general para las GPx descrita por Rotruck (Rotruck et al, 1973) es la siguiente:

$$ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

En este esquema ROOH es cualquier hidro o lipo peróxido, GSH es el glutatión reducido, ROH es el peróxido reducido y GSSG es glutatión en su forma oxidada.
El glutatión reducido es formado desde su forma oxidada vía la acción de la enzima Glutatión Reductasa. Este proceso de reducción requiere NADPH que es provisto por la Vía de las Pentosas Fosfato.

La principal forma de la GPx es la Se-dependiente (selenoproteinas). La importancia del Selenio en la nutrición animal yace en el hecho de que tanto el primer (neutralizando el H_2O_2 formado por la acción de la SOD) como el segundo nivel (neutralizando hidroperóxidos) de defensa antioxidante descansan en la actividad de la GPx Se-dependiente, lo que depende de un estado adecuado de Se en la célula. La lipoperoxidación por ejemplo es acelerada cuando existe deficiencia de Se (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Hay diferentes formas en las cuales el sistema antioxidante puede ser alterado o regulado. La regulación más importante es la respuesta animal a las condiciones de estrés sintetizando enzimas antioxidantes (SOD y GPx por ej.) Sin embargo esta respuesta solo será efectiva si están disponibles los cofactores necesarios para la acción enzimática. Por lo tanto el aporte nutricional de Se es un factor crucial en la regulación de la actividad de la GPx y la eficiencia del sistema antioxidante (Surai, 1999a).

Tipos de GPx

Al principio la acción de la GPx fue descripta por Mills en 1957 como protectora de los glóbulos rojos contra la hemólisis por oxidación. Arthur (Arthur, 2000) describe 4 isoformas conocidas de GPx que contienen selenocisteína en su sitio activo y al menos otras dos proteínas con más del 40% en similitud de secuencia con la GPx citosólica, pero que no contienen selenocisteina.

En la actualidad se sabe que la familia descripta originalmente como "Glutation Peroxidasas" incluyen también dichas enzimas que no contienen Se en su sitio activo (GPx5, GPx6 en mamíferos exceptuando humanos, GPx7 y GPx8) y que algunas de ellas no descansan en el GSH como reductor sino que prefieren algunos tipos de redoxinas, por lo que el término Glutation Peroxidasas solo describe correctamente a un pequeño subgrupo de la familia de las peroxidasas. (Flohé y Maiorino, 2012)

La primera enzima descubierta por Mills es ahora llamada **GPx1**, o también GPx citosólica o celular. GPx1 puede metabolizar H_2O_2 y un rango de peróxidos orgánicos, incluyendo colesterol y peróxidos de ácidos grasos de cadena larga. Sin embargo, a menos que sea acompañada de una actividad fosfolipasa que libere los ácidos grasos, la GPx1 no puede metabolizar hidroperóxidos de ácidos grasos en fosfolípidos. A pesar del amplio rango de peróxidos que utiliza como sustrato, es muy específica hacia el glutatión como sustrato reductor. Por esto la actividad de la GPx es a menudo discutida en paralelo con la actividad de la glutatión reductasa, la que mantiene un suministro constante de glutatión a partir de la forma oxidada GSSG.
En todas las especies examinadas GPx1 es una proteína tetramérica con 4 subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene un residuo de selenocisteína, el que está en el sitio activo de la enzima (Arthur, 2000).
El reemplazo de selenocisteína por cisteína en el sitio activo de la GPx causa una gran disminución de la actividad enzimática. (Rocher et al, 1992). Esto es consistente con que la Selenocisteína es un catalizador redox mucho más eficiente que la cisteína a pH fisiológico (Arthur, 2000). En contraste con el grupo tiol en las enzimas que contienen cisteína, el selenol está completamente ionizado a pH fisiológico, lo que lo hace más reactivo que el grupo tiol. (Behne et al, 2001)

Experimentos con ratones GPx1 KO mostraron que GPx1 no puede ser reemplazada por ninguna otra selenoproteína en la protección del estrés oxidativo generalizado y que GPx1 tiene una función antioxidante primaria in vivo.
El término jerarquía de selenoproteína describe cómo éstas no son uniformemente abastecidas con Se, especialmente cuando el Se se convierte en limitante. Algunas selenoproteínas desaparecen rápido; otras permanecen estables hasta que la deficiencia se vuelve más severa. En esta jerarquía GPx1 tiene el último lugar. (Flohé y Maiorino, 2012)

La segunda forma de GPx que se encuentra en el citosol y también es tetramérica ha sido llamada GPx gastrointestinal y ahora se denomina **GPx2**. Tanto la GPx1 como la GPx2 tienen especificidad de sustrato similar porque reducen peróxidos de hidrógeno o hidroperóxidos de ácidos grasos con rapidez pero no hidroperóxidos en fosfolípidos.
La GPx2 es principalmente expresada en el sistema gastrointestinal incluyendo el epitelio del esófago y en humanos también en el hígado. Se ha sugerido que esta enzima actúa como una barrera contra la absorción de hidroperóxidos provenientes de la comida. La función de GPx2 en el intestino parece ser única y no puede ser fácilmente reemplazada por otra selenoproteína, ni siquiera una de la misma familia.
Dentro de la familia de las GPx Se-dependientes la GPx2 está primero en la jerarquía, seguida de GPx4, GPx3 y GPx1. (Flohé y Maiorino, 2012)

La actividad GPx en plasma tiene especificidad de sustrato similar a la GPx1. GPx del plasma o **GPx3** es una isoenzima con propiedades distintivas, es una glicoproteína con una función extracelular (Takahashi et al, 1987). Junto a la proteína P, GPx3 tienen más del 97% del Se plasmático en ratones. Este alto índice en plasma puede apuntar a un rol de trasporte y homeostasis de Se. Su mensajero es encontrado predominantemente en el riñón, corazón, placenta, pulmones, células gastrointestinales y tiroides. Como GPx3 requiere cantidades mili molares de Glutatión para su actividad y en plasma sólo hay aprox. 0,5 μM, han habido dudas en cuanto a su actividad como peroxidasa en plasma. Sin embargo el sistema tioredoxina también puede actuar como donador de electrones para GPx3 en humanos a concentraciones relevantes en plasma. (Arthur, 2000). También existe la hipótesis de que GPx3 funciona como un buffer redox para la discriminación entre estímulos inflamatorios irrelevantes y serios. (Flohé y Maiorino, 2012).

La **GPx4** o GPx de hidroperóxidos en fosfolípidos es la cuarta isoenzima que contiene Selenio que ha sido caracterizada. Contrasta con GPx1 en que es un monómero que puede reaccionar con hidroperóxidos en fosfolípidos como sustrato. Esta actividad con hidroperóxidos en fosfolípidos es estimulada por la acción de detergentes lo que ha llevado a suponer que la enzima está asociada a la membrana in vivo (Ursini et al, 1985). GPx4 puede usar peróxido de hidrógeno como sustrato así como también un amplio rango de otros hidroperóxidos lípidos, como fosfolípidos, colesterol e hidroperoxidos colesterol ésteres, incluso si están insertados en biomembranas o lipoproteínas. El hecho de ser un monómero puede permitirle unirse a una más amplia gama de sustratos que las GPx tetraméricas. (Maiorino et al, 1991). Reacciona con GSH pero no con tioredoxinas y cuando GSH se vuelve limitante puede usar como sustrato tioles proteicos como reductores. Por lo tanto dependiendo de la disponibilidad de GSH, GPx4 puede actuar como una GSH peroxidasa o una tiol peroxidasa. (Flohé y Maiorino, 2012)
GPx4 existe en 3 diferentes isoformas, una citosólica (cGPx4), una mitocondrial (mGPx4) y una esperma nuclear (snGPx4). Mientras cGPx4 es ubicua en células, mGPx4 y snGPx4 son mayormente expresadas en testículos con sólo cantidades marginales en otros tejidos.

GPx5 es una proteína específica del epidídimo. Es el homólogo más cercano a GPx3. La mayor diferencia es que tiene cisteína en vez de selenocisteína en el sitio activo. Junto a GPx3, GPx5 representa más del 95% del ARN y proteínas GPx del epidídimo. Fue encontrada en células epiteliales y en el lumen del epidídimo, pero también asociada a la región de la cabeza del espermatozoide que transita a través del epidídimo hacia los vasos deferentes. Es abundantemente expresada en células epiteliales del caput del epidídimo y puede regular la concentración de los hidroperóxidos manteniendo una concentración óptima para la tarea de la snGPx4. En el lumen del epidídimo se une a la cabeza del espermatozoide para acompañarlos al cauda y prevenir que sean dañados por H_2O_2. Se ha sugerido que también previene la reacción prematura del acrosoma durante el almacenamiento en el cauda. Su cinética y especificidad de sustrato tienen que ser aún investigadas. (Flohé y Maiorino, 2012)

GPx6 es un homólogo cercano a GPx3. Es una selenoproteína en humanos pero no contiene Se en roedores y otras especies. Es expresada en embriones de ratones y en glándula de Bowman, el sitio donde moléculas odorantes son degradadas después de haber transducido sus señales. Hasta ahora GPx6 no ha sido purificada y no existen estudios de cinética.

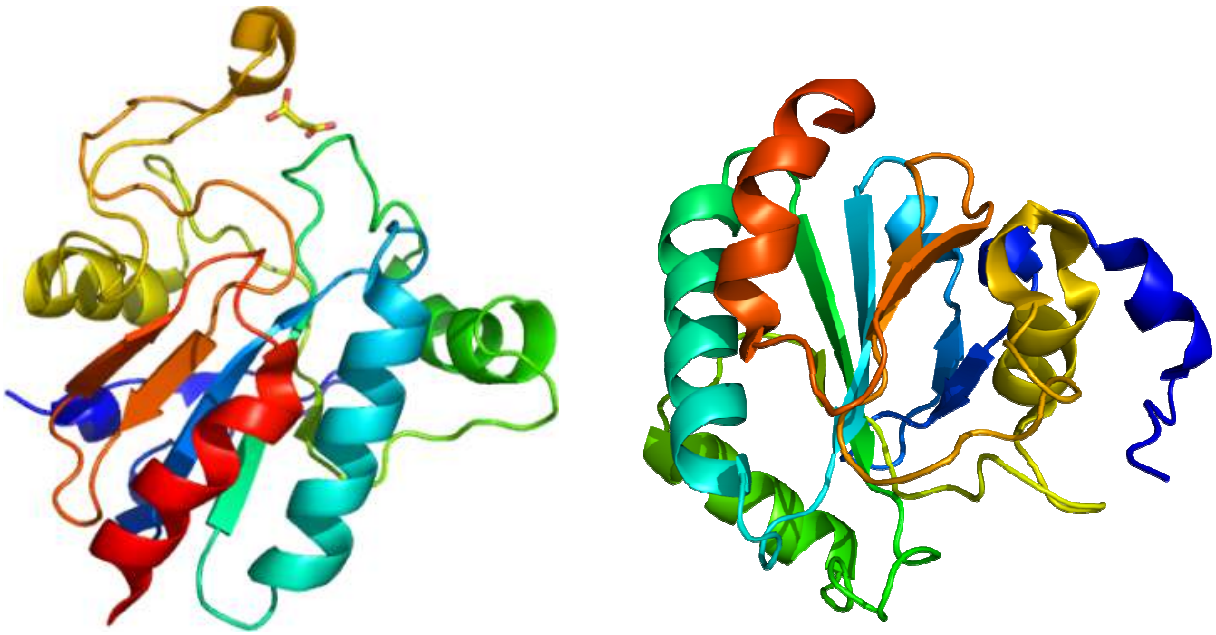
La **GPx7** fue descripta primeramente como una nueva glutatión peroxidasa con una Cys en lugar de la Sec en el centro catalítico de fibroblastos embrionarios de ratones Brca1-null. Tiene homología con GPx4, también es un monómero, pero tiene poca actividad GPx cuando es expresada y purificada de *E. coli*. GPx7 ha sido encontrada en el lumen del retículo endoplasmático. Existe la especulación de que GPx7 puede funcionar como un supresor tumoral. También está siendo discutido su rol, junto a GPx8 en el plegamiento de proteínas.

GPx8 ha sido detectada en anlálisis filogenéticos como un nuevo miembro perteneciente a la familia GPxs en mamíferos y anfibios. Es una proteína de membrana del retículo endoplasmático. Pero poco se conoce acerca de sus funciones. Junto a GPx7 se ha sugerido que actúe protegiendo el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático. (Flohé y Maiorino, 2012)

Existen también muchas moléculas que tienen actividad GPx Se-independiente. Estas actividades están mayormente asociadas con glutatión-S-transferasas, una familia de enzimas con su actividad dirigida mayormente a los hidroperóxidos orgánicos y con muy poca actividad contra el peróxido de hidrógeno (Hayes and Strange, 1995)

Estructura de las Glutation Peroxidasas

El centro catalítico de las GPxs está compuesto por Sec o Cys, Gln, Trp y Asn. Esta estructura de 4 aminoácidos está conservada en todos los miembros de la familia GPx con algunas excepciones.
GPx1, 2, 4 5 y 6 son homotetrámeros lo que puede determinar la especificidad por hidro peróxidos solubles de bajo peso molecular. GPx4, 7 y 8 son monómeros que probablemente habilitan las reacciones con lipo hidroperóxidos más complejos, lo que hasta ahora ha sido probado solamente para GPx4. GPx3 es una excepción porque al parecer también acepta hidroperóxidos complejos como hacen los monómeros. (Flohé y Maiorino, 2012)



A **B**

Figura 2. A. Estructura tridimensional de GPx1 humana (homotetrámero); **B.** Estructura tridimensional GPx4 humana (monómero). Tomado de GPx Humanas: http://bioinformatica.upf.edu

Mecanismo de acción de la GPx Se dependiente

El selenol (-SeH) en las GPx que contienen Sec, reacciona en forma de selonolato con H_2O_2 para dar ácido selenínico (-SeOH) el cual es reducido a –SeH de nuevo por 2 moléculas de GSH, formando GSSG y agua. (Flohé y Maiorino, 2012)

$$GPx\text{-}Se^- + H_2O_2 \rightarrow GPx\text{-}SeOH + OH^- \quad (1)$$

$$GPx\text{-}SeO^- + H^+ + GSH \rightarrow GPx\text{-}Se\text{-}SG + H_2O \quad (2)$$

$$GPx\text{-}Se\text{-}SG + GSH \rightarrow GPx\text{-}Se^- + H^+ + GSSG \quad (3)$$

Aunque el ácido selenínico es citado frecuentemente como intermediario en el ciclo, éste nunca ha sido detectado hasta ahora.

La figura 3 muestra el ciclo catalítico de las Glutation Peroxidasas. En la parte peroxidativa del ciclo, el selenol en GPx se oxida a Ácido selenínico por un hidroperoxido (ROOH). (Ecuación (1)). Aquí el primer GSH forma un selenodisulfuro con el ácido selenínico, y el oxígeno es removido formando agua. El segundo GSH reduce el seleno disulfuro por un intercambio tiol-disulfuro. De esta manera el GSSG es liberado y la enzima es regenerada a su forma selenol, la cual está lista para el próximo ciclo.

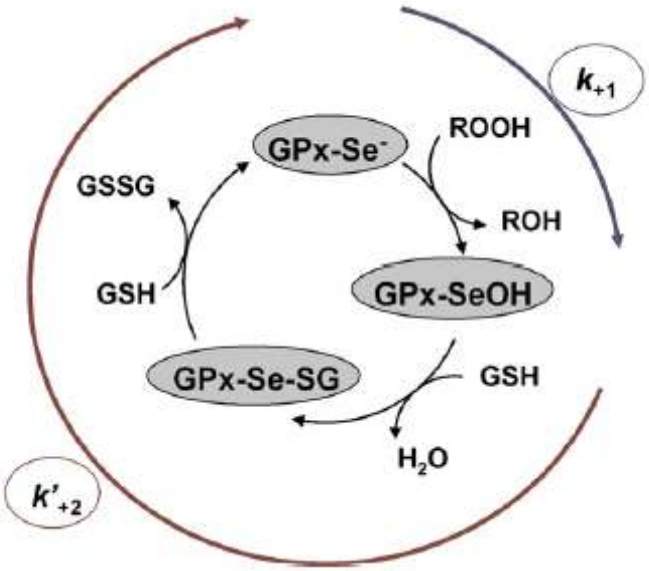


Figura 3. Ciclo catalítico de las Glutation Peroxidasas (esquema básico evaluado para GPx1, válido también para GPx3 y GPx4). (Flohé y Maiorino, 2012)

La cinética de la GPx ha sido evaluada hace años para GPx1, y resultó ser idéntica para GPx3 y GPx4. El ciclo se divide en una parte peroxidativa y en una reductiva. La constante cinética para la reacción reductiva k'+2 es de 2 a 3 órdenes menor que k'+1, constante cinética para la parte peroxidativa del ciclo (con órdenes > 10^7 $M^{-1}s^{-1}$). Con este tan alto rango para los valores de la k'+1 GPx1 es oxidada casi un 100% si las concentraciones de los hidroperóxidos y de GSH son similares. Pero como las concentraciones de GSH en vivo están en el rango de 1-10 mM y la de los peróxidos usualmente no llegan a valores micromolares, la enzima está casi completamente reducida y la velocidad es independiente de GSH. Esto significa que pequeños cambios en la concentración de GSH no influirán en la velocidad en que los peróxidos son removidos.
In vitro la situación es diferente porque las concentraciones de GSH y de peróxido son más cercanas y la reacción se vuelve dependiente de la concentración de GSH. Esto hay que tenerlo en cuenta al momento de medir actividades de GPx. Para que sean comparables los resultados obtenidos en diferentes laboratorios tienen que ser medidos a valores constantes y definidos de concentración de GSH. (Flohé y Maiorino, 2012).

Genética de la actividad GPx

Muchos factores son conocidos que afectan la actividad de la GPx, incluyendo el Se dietario, edad y sexo (por distribución distintiva de Se entre tejidos según prioridad) y factores ambientales como la exposición al ozono o ingestión de lípidos peroxidados.
Existe también variación fenotípica de la actividad de la GPx entre diferentes especies animales y dentro de las mismas, según órgano, sexo, edad.
Es interesante notar que estudios en las respuestas de crecimiento en pollos jóvenes a deficiencias nutricionales en Selenio mostraron que estas tienen un componente hereditario. (Bunk y Combs, 1981) Los resultados mostraron que existe viabilidad para el desarrollo a través de reproducción selectiva líneas de pollos que difieren en su sensibilidad a la deficiencia dietaria en Selenio. Por lo tanto las consecuencias de la deficiencia nutricional de Se puede diferir entre distintos genotipos. Esto es de fundamental importancia para comprender el rol de Se en el metabolismo normal y tiene

significancia práctica para la alimentación avícola en partes del mundo donde la deficiencia de Se es endémica (Cunningham et al. 1987).

Regulación

La catalasa (CAT) al igual que la GPx se encarga de eliminar el H_2O_2 y su localización celular es similar, pero sus mecanismos de regulación son diferentes.
La GPx y la glutatión reductasa se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd) y la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. Además algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral TNF, el interferon IFN y la interleukina-1 IL-1 son capaces de inhibir la actividad de la GPx. (Lam et al, 1993) (Zachara, 1991)

Implicancias en la calidad de la carne

En el tejido muscular las funciones antioxidantes de la vitamina E y del Se vía la actividad GPx persisten después de la matanza y retrasan el comienzo de la reacciones de oxidación en la carne y sus productos (DeVore et al, 1983).
Estas funciones antioxidantes son importantes porque la oxidación de los lípidos del músculo después de la matanza puede afectar adversamente el sabor y los valores nutritivos de la carne fresca, congelada y cocida y sus productos (Morrissey et al, 1998). En carnes rojas la oximioglobina muscular oxida en presencia de lípidos oxidables y una coloración marrón indeseable se produce (Greene et al, 1971).
Según reporta Mikulski et al, 2009, el aumento de la concentración de Se en tejido no sólo disminuye el estrés oxidativo, incluyendo protección de los ácidos grasos insaturados contra el daño peroxidativo, sino también reduce la pérdida de peso por goteo de la pechuga y la ocurrencia de obtener carne pálida, blanda y exudativa. Por lo tanto el Se dietario mejoraría la calidad y estabilidad oxidativa de la carne.

Introducción al Metanálisis

El metanálisis (MA), término propuesto por Glass en 1976, es un conjunto de técnicas estadísticas diferentes cuyo objetivo es hacer una síntesis cualitativa y cuantitativa de los resultados de los diferentes estudios independientes que tratan de un mismo tema. (Fernández-Ballart et al, 1991) sintetizando los resultados de estudios individuales en un nuevo resultado (Berman et al, 2002).

Sus objetivos son:

- Aumentar la potencia o poder estadístico, mejorando la precisión de la estimación del efecto de interés.
- Obtener conclusiones cuando los resultados son contradictorios.
- Responder a preguntas no planteadas en los estudios originales.

El metanálisis intenta alcanzar al menos una de dos metas: resumir la información disponible sobre un tema o explicar la variabilidad entre diferentes estudios del mismo tema. (Berman et al, 2002)

Los MA, al combinar los resultados de los ensayos originales, aumentan el tamaño de la muestra y por lo tanto aumentan su potencia estadística, lo que tiene particular importancia cuando las diferencias observadas son pequeñas. (Sandoya, 2008)

El MA vino a reemplazar a la revisión descriptiva como método para analizar la evidencia. Al no existir reglas formales para su realización, la revisión clásica es subjetiva y por lo tanto es proclive el sesgo y al error. El MA dotó de rigor al proceso de búsqueda, selección, análisis e integración estructural de la evidencia, brindando una visión más objetiva de la misma. (Sandoya, 2008)

En el Acuerdo *Quorom*, Conferencia sobre Calidad de Elaboración de los Informes de los Metanálisis (Moher et al, 2000) para la Mejora de la calidad de los informes de los metanálisis de ensayos clínicos controlados, se produjo una declaración, un protocolo de control de calidad y un diagrama de flujo como guía para la elaboración y diagramación de los metanálisis. Dicho protocolo se tomó como pauta para la realización del presente metanálisis y el diagrama de flujo correspondiente se muestra en la Figura 4.

Objetivos del análisis

En el presente estudio se analiza el efecto de la suplementación con Selenio (Se) en la actividad de la Glutatión Peroxidasa para diferentes especies y órganos en distintas situaciones que incluyen:

1) Con o sin estrés inducido.
2) Partiendo de un estado inicial deficiente en Se.
3) Partiendo de un estado inicial basal que cumple requerimientos de Se.
4) Suplementación con Se orgánico o inorgánico.

La **objetivo** del presente análisis es estudiar la tendencia del efecto de la suplementación con Se en la dieta del animal sobre la actividad de la Glutatión Peroxidasa en diversas situaciones, realizando las comparaciones pertinentes entre distintos grupos afines.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de literatura

Se realizó una búsqueda electrónica de literatura para identificar estudios sobre el tema a través del servidor EBSCO de la Universidad de la República en las siguientes bases: Academic Search Complete, CAB Abstract, Directory of Open Access Journals, MEDLINE, Ovid Journals, Science Direct y Scopus, utilizando las palabras clave: GPX (abstract) AND Selenium (abstract) AND muscle (all text) sin restricciones de fecha, idioma o tipo de documento. También fue realizada una búsqueda de literatura "furtiva" utilizando el buscador de Google con el fin de minimizar el sesgo de publicación que se produce al buscar exclusivamente literatura divulgada en revistas científicas arbitradas.

Selección de estudios: Criterios de inclusión y exclusión

Posteriormente se procedió a filtrar la literatura recogida en el paso previo. De la misma, 4 estudios tuvieron que ser descartados por estar redactados en idiomas que sobrepasaban la

capacidad de comprensión de la autora del presente trabajo. Dichos estudios son enumerados en la Tabla 2.

Tabla 2. Estudios descartados por causa del idioma en que fueron redactados.

Referencia	País	Idioma
Wang et al, 2010	China	Chino
Tian et al, 2001	China	Chino
Kauf et al, 1997	Alemania	Alemán
Gabryszuk et al, 2008	Polonia	Polaco

En una posterior instancia fueron descartados de los resultados de la búsqueda aquellos artículos que no expresaban medidas de actividad GPx vs concentración de Se en forma cuantitativa (ya sea a través de gráficas o tablas).
De esta selección hubo 4 artículos cuyos textos completos no pudieron ser obtenidos. Se procedió por lo tanto a solicitar vía correo electrónico a sus autores de ser posible los correspondientes textos. Se intentó contactar a los autores de 3 de los 4 artículos, los que proporcionaban datos de contacto vía correo electrónico, pero al momento de la redacción del presente trabajo no se ha obtenido respuesta. Estos artículos son detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Artículos cuyos textos completos no pudieron ser obtenidos.

Referencia	Título
Ehret et al, 1989	Erythrocyte glutathione peroxidase activity as an indicator of selenium status in an intensively-managed beef herd.
Tallandini et al, 1996	Toxic levels of selenium in enzymes and selenium uptake in tissues of a marine fish.
Gu et al, 1998	Distribution of selenium between plasma fractions in guinea pigs and humans with various intakes of dietary selenium.
Tessier et al, 1995	Muscle GSH-Px activity after prolonged exercise, training, and selenium supplementation.

Continuando con el proceso de selección y teniendo en cuenta el requerimiento de homogeneidad clínica en cuanto a los métodos utilizados para cada artículo a incluir en el metanálisis (Sandoya, 2008), se descartaron estudios que no cumplían con las siguientes pautas: administrar Se exclusivamente a través de la dieta del animal, utilizar animales vivos y no cultivos celulares en el ensayo, no agregar concomitantemente otros suplementos nutricionales (ej. vitamina E). En adición a esto, fueron también descartados datos que informaban suplementación con Se en órganos como cerebro y glándula adrenal por existir evidencia de que existe alta retención de Se en dichos órganos aún en animales alimentados con dieta deficiente en Se. (Behne et al, 1988)

Varios otros parámetros fueron evaluados al momento de seleccionar los estudios a incluir en el MA y a partir de los mismos fueron establecidos criterios posteriores de inclusión y exclusión. Dichos criterios e información complementaria sobre los estudios utilizados para el MA se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Información complementaria sobre los estudios utilizados en el metanálisis.

Parámetro	Detalle
Número de sujetos	Fueron utilizados solamente datos que llegaran a un mínimo de 6 sujetos (n=6) para cada grupo tratamiento.
Fuentes de Selenio	Las fuentes de Se utilizadas para la suplementación en los estudios eran divididas en dos grupos: orgánicas e inorgánicas. Las orgánicas incluyen: SelenoMetionina, Selenocistina, levadura enriquecida con Se y B-Traxim (Leeson et al, 2008). Las fuentes inorgánicas incluyen Selenio como Selenito (Na_2SeO_3) y Selenato de Sodio (Na_2SeO_4). Fueron utilizados datos que fueran comparables en cuanto al efecto de ambas fuentes de Se ($n \geq 6$ para cada fuente de Se) sobre la actividad de la GPx.
Duración del tratamiento	Fueron utilizados solamente estudios en los cuales la duración del tratamiento de suplementación con Se fuera mayor o igual a 4 semanas.
Dosis de Se suplementado	Suplementación alta ≥ 1ppm (rango de dosis de los estudios utilizados: entre 1 y 4 ppm). Suplementación media-baja < 1ppm (rango de dosis de los estudios utilizados: entre 0.01 y 0.46 ppm).
Determinación de actividad GPx	En todos los estudios utilizados en el MA la actividad GPx fue medida por el método descripto por Paglia y Valentine, 1967.
Medida de promedio act. GPx	Los datos de actividad de GPx (media) fueron extraídos de tablas o gráficas según fuera expresado en cada estudio, así como también sus errores o desviaciones estándar.
Cálculo SD	En los casos donde la desviación estándar (SD) no era informada directamente en el estudio, ésta fue calculada como $SD = SE \times \sqrt{n}$, siendo SE definido como el error estándar. (Cochrane Handbook, 2011)
Fechas de publicación	Rangos de fecha de publicación de estudios utilizados: 1974 – 2009.
Órganos	Se definieron 4 grupos de órganos: Hígado, músculo, sangre y testículo. En el grupo definido como Hígado se incluye también otras vísceras (riñón, pulmón, bazo, mucosa duodenal) y el grupo denominado Sangre incluye plasma y glóbulos rojos (RBC).
Especies utilizadas	Se evaluaron resultados para ratas y aves. Éste último grupo incluyó gallinas ponedoras, pollos parrilleros y pavos. En ambos casos no se hizo distinción de género.
Unidad de Actividad GPx	nmol NADPH/min/mg proteína (y sus equivalentes: mU/min/mg proteína y U/g/min/g proteína).

Determinación de actividad de GPx

En los artículos utilizados para realizar el metanálisis la actividad de la enzima GPx fue medida utilizando el método de la reacción acoplada con Glutatión Reductasa (GR). (Paglia y Valentine, 1967)
El glutatión oxidado (GSSG), producido por la reducción de hidroperóxidos por la GPx, es reciclado a su estado reducido por la GR y NADPH:

$$R\text{-}O\text{-}O\text{-}H + 2GSH \xrightarrow{GPx} R\text{-}O\text{-}H + GSSG + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

La oxidación de NADPH a $NADP^+$ está acompañada por una disminución en la absorbancia a 340 nm. En condiciones donde la actividad de la GPx es limitante de la velocidad, la tasa de decrecimiento de la A_{340} es directamente proporcional a la actividad de la GPx en la muestra.

Evaluación de calidad de los estudios utilizados

Para la evaluación de la calidad de los estudios utilizados en el metanálisis se usó como guía la tabla descripta a esos efectos en Berman et al, 2002. Los parámetros allí descriptos fueron adaptados a las condiciones del presente metanálisis (Apéndice 1). Algunos de los ítems relevantes para este estudio ya estaban incluidos en los criterios de inclusión y exclusión. Se evaluaron 17 ítems. El puntaje total fue basado en la suma de los ítems individuales, los cuales se puntuaron 1 cuando la respuesta era Sí, y 0 cuando la respuesta era No (revertido cuando era necesario para mantener la coherencia).
De los 15 estudios utilizados, 12 tuvieron puntuación 16/17, 1 con puntuación 15/17, 1 con puntuación 13/17 y el restante puntuó 17/17. Estos resultados fueron utilizados solamente como una característica descriptiva de cada estudio y no como pauta de selección eliminatoria.
Los datos y descripción de los estudios utilizados para realizar el MA se detallan en la Tabla 5.

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos fue utilizado el programa NCSS 2007, con el cual se realizó el Metanálisis de Medias con un $\alpha = 0.05$ y un One Way ANOVA para cada grupo como complemento del análisis, estudiando el efecto de Act. GPx vs Dosis de Se y efecto de Act. GPx vs Tipo de Se (orgánico o inorgánico). Para esto último se refirió al Turkey-Kramer Multiple Comparison Test.
La homogeneidad fue evaluada según el Test del Efecto de Igualdad (Cochran's Q) y el Gráfico Radial (Radial Plot o Gráfico de Galbraith).
El sesgo de publicación fue evaluado a través de un Diagrama de Embudo (Funnel Plot), para lo cual se graficó el Error Estándar vs Media Act. GPx suplementada con Se. Estos gráficos se muestran en el Apéndice 2.

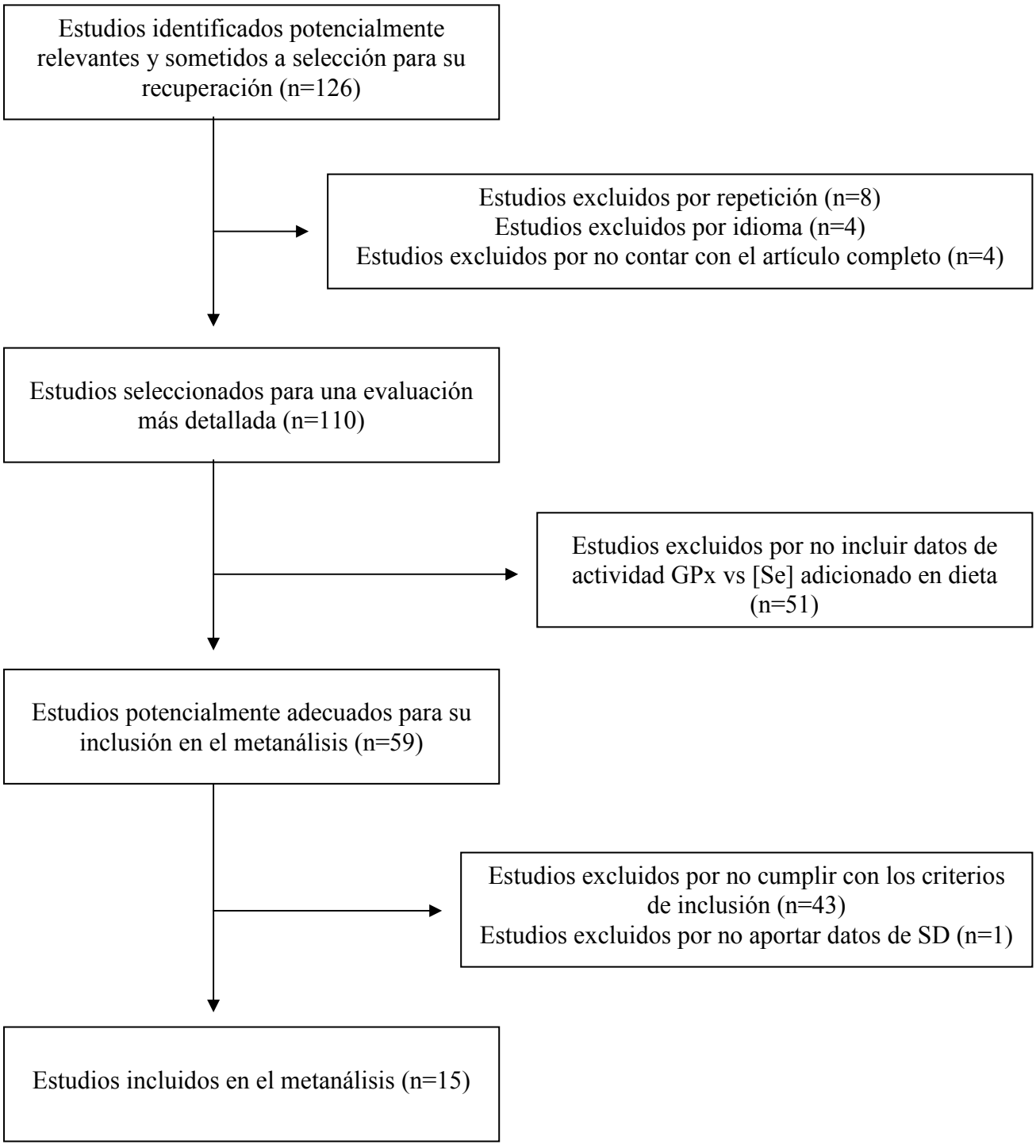


Figura 4. Diagrama de flujo que muestra el número de estudios identificados, incluidos y excluidos y las razones para su exclusión.

Tabla 5. Resumen de los estudios utilizados en el metanálisis.

Estudio	Referencia	País[1]	Especie	Fuente Se[2]	Duración Tratamiento (semanas)	Estrés	Fuente de datos[3]
Buckman *et al*, 1993	E1	US	Ratas	inorgánico	21	No	Gráfica
Tabatabaei et al, 2008	E3	IR	Ratas	inorgánico	6	No	Tabla
Omaye *et al*, 1974	E6	US	Pollos	Inorgánico orgánico	4	No	Tabla
Leeson et al, 2008	E7	CH	Pollos Gallinas	Inorgánico orgánico	6	No	Tabla
Yoon et al, 2007	E11	US	Pollos	Inorgánico orgánico	6	No	Tabla
Payne et al, 2005	E12	US	Pollos	Inorgánico orgánico	12	No	Tabla
Deagen et al, 1986	E22	US	Ratas	Inorgánico orgánico	9	No	Tabla
Petrovic et al, 2006	E25	SK	Gallinas	Inorgánico orgánico	36	No	Tabla
Whanger et al, 1988	E26	US	Ratas	Inorgánico orgánico	9	No	Tabla
Yeh et al, 1997	E27	US	Ratas	inorgánico	8	No	Gráfica
Sun et al, 2001	E31	US	Ratas	inorgánico	14	No	Gráfica
Mikulski et al, 2009	E38	PL	Pavos	Inorgánico orgánico	16	No	Tabla
Chanoine et al, 2004	E42	CA	Ratas	inorgánico	4	No	Gráfica
Mueller et al, 2009	E44	DE	Pavos	inorgánico	5	No	Tabla
Pirsljin et al, 2005	E47	HR	Pollos	orgánico	4-6	No	Tabla

[1]Códigos de países de acuerdo con las abreviaciones de los nombres en inglés dados por el código de elementos ISO 3166-1-α-2. [2]Fuente de Selenio usado para suplementar la dieta: orgánico o inorgánico. [3] Formato de la fuente de los datos extraídos del artículo.

De cada artículo incluido en el metanálisis detallado en la Tabla 5 fueron extraídos más de un dato, que fueron luego agrupados según diseño del tratamiento para realizar los distintos metanálisis que se muestran en la sección Resultados.

RESULTADOS

Metanálisis de Medias

Para cada estudio descripto en la Tabla 5 se pudo extraer más de una medida, correspondiente a distintas dosis de suplementación con Se, ya sea orgánico o inorgánico. Esto se detalla en las tablas de resultados para cada grupo.
Las distintas medidas fueron agrupadas según especie, tejido, dieta inicial y dosis de suplementación con Se.
El test de heterogeneidad realizado a los distintos grupos de datos dio significativo, revelando que los datos eran heterogéneos en todos los casos, lo cual fue confirmado por los Radial Plots o Gráficos de Galbraith, por lo que se utilizó el Modelo de Efectos Aleatorios para realizar cada MA.
La descripción detallada del tratamiento utilizado para cada grupo se observa en la Tabla 4.

GRUPO 1 : Aves, Sin Estrés, Dieta Basal en Se + Suplementación con Se Dosis Media-Baja.
GRUPO 2: Aves, Sin Estrés, Dieta Deficiente en Se + Suplementación con Se Dosis Media-Baja
GRUPO 3: Ratas, Sin Estrés, Dieta Deficiente en Se + Suplementación con Se Dosis Alta.
GRUPO 4: Ratas, Sin Estrés, Dieta Deficiente en Se + Suplementación con Se Dosis Media-Baja.

Si bien se tenían datos para varios órganos en cada grupo, sólo fue posible realizar el MA para los tejidos que tuvieran como mínimo 6 medidas (ver Criterios de Inclusión y Exclusión en Tabla 4).
Se muestran sólo los resultados de metanálisis de tejidos con los cuales se pudo realizar comparaciones entre distintos grupos de tratamiento. En las tablas 6, 8, 10, 12, 14 y 16 se detallan los datos utilizados para la ejecución de los distintos metanálisis.

Comparación entre Grupo1-Sangre y Grupo2-Sangre

Tabla 6. Valores Grupo 1 – Sangre

Referencia[1]	[Se] sup[2] (ppm)	N[3]	Grupo Control		Grupo Suplementado	
			Media[4] Act. GPx	SD[5]	Media[4] Act. GPx	SD[5]
E25-61	0.4	7	177.10	66.67	430.40	66.67
E7-44	0.3	8	173.00	39.74	166.00	39.74
E11-51	0.3	5	10.80	1.88	16.60	1.88
E12-52	0.3	6	5.41	0.54	5.74	0.54
E38-127	0.3	240	6.54	4.35	6.98	4.35
E25-218	0.4	7	177.10	66.67	414.20	66.67
E7-202	0.3	8	116.00	39.74	106.86	39.74
E11-211	0.1	5	10.80	1.88	11.30	1.88
E11-212	0.2	5	10.80	1.88	13.10	1.88
E11-213	0.3	5	10.80	1.88	16.80	1.88
E12-214	0.3	6	5.41	0.54	5.31	0.54
E38-230	0.3	240	6.54	4.35	9.87	4.35

[1] Referencia al Nº de estudio-Nº de medida.
[2] Concentración de Se con el cual se suplementó la dieta.
[3] Número de medidas con la cual se calculó la media de Actividad de GPx.
[4] Medidos en nmol NADPH/min/mg proteína.
[5] Desviación Estándar de la media.

Al realizar un primer MA con los datos de Grupo1-Sangre se observó que las medidas E25-61 y E25-218 daban valores más elevados que el resto (100 veces mayor que el promedio). Una de las causas puede ser la duración del tratamiento que fue de 36 semanas, mientras que para el resto de los estudios variaban entre 4 y 16 semanas. Las medidas E7-44 y E7-202 dieron valores negativos. No se vio razón aparente para este efecto. El artículo original establece que no hubo efecto para el grupo suplementado. Se realizó un segundo Metanálisis excluyendo estas medidas. El resultado se muestra en la Tabla 7 con su correspondiente Forest Plot (Figura 5).

Tabla 7. Resultados del MA Grupo1-Sangre.

Referencia	Δ Medias[1]	SE[2]	Intervalo de Confianza 95%		% Efecto de Peso[3]
			Límite Inferior	Límite Superior	
E11-51	5.8000	1.1879	3.0606	8.5394	10.3302
E12-52	0.3300	0.3118	-0.3647	1.0247	14.8151
E38-127	0.4400	0.3972	-0.3406	1.2206	14.5242
E11-211	0.5000	1.1879	-2.2394	3.2394	10.3302
E11-212	2.3000	1.1879	-0.4394	5.0394	10.3302
E11-213	6.0000	1.1879	3.2606	8.7394	10.3302
E12-214	-0.1000	0.3114	-0.7939	0.5939	14.8161
E38-230	3.3300	0.3974	2.5491	4.1109	14.5237
[Combinado]					
Promedio	2.0898	0.6696	0.7774	3.4023	

[1] Diferencia entre las medias de Act. GPx (Tratamiento – Control)
[2] Error Estándar
[3] Porcentaje de peso que tiene la medida en el MA.

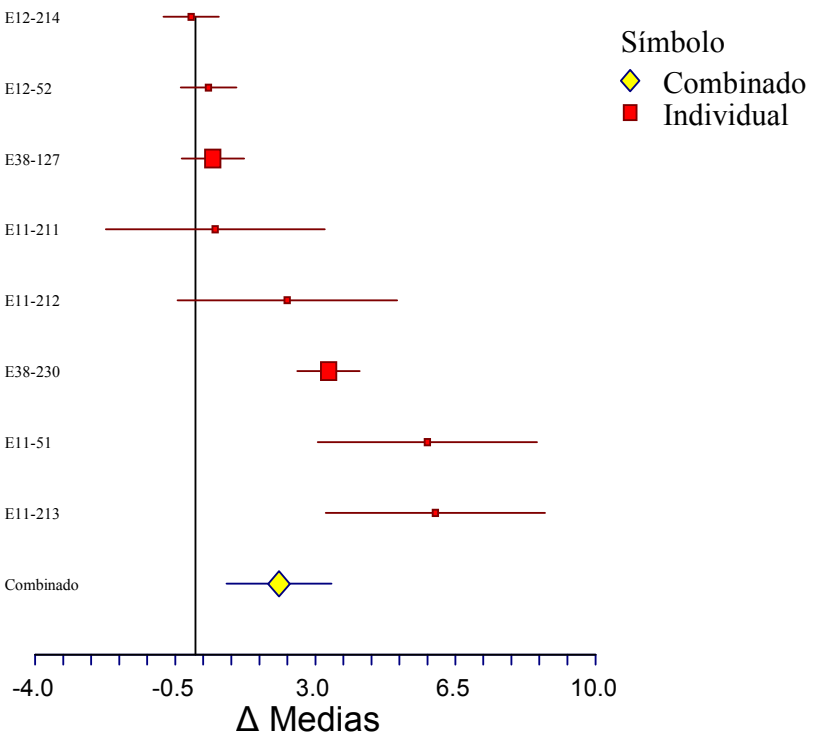


Figura 5. Forest Plot Grupo1-Sangre.

El Forest Plot revela que existen resultados no significativos (la línea del intervalo de confianza interseca la línea vertical 0.0), pero la medida del promedio es significativa. El tamaño del símbolo se correlaciona con el peso que tiene cada estudio en el MA.

Tabla 8. Valores Grupo2-Sangre

Referencia[1]	[Se] sup[2] (ppm)	N[3]	Grupo Control		Grupo Suplementado	
			Media[4] Act. GPx	SD[5]	Media[4] Act. GPx	SD[5]
E6-39	0.025	2	1.20	0.20	5.4	3.30
E6-40	0.050	5	1.20	0.20	7.5	1.70
E6-41	0.100	5	1.20	0.20	10.4	1.50
E6-42	0.140	6	1.20	0.20	11.0	2.00
E44-136	0.100	12	7.06	1.66	16.9	6.11
E44-137	0.200	12	7.06	1.66	24.0	6.76
E44-138	0.300	12	7.06	1.66	27.5	6.08
E6-195	0.013	5	1.20	0.20	1.3	0.40
E6-196	0.025	6	1.20	0.20	3.2	0.90
E6-197	0.050	5	1.20	0.20	6.7	1.90
E6-198	0.100	6	1.20	0.20	12.4	5.60
E6-200	0.460	4	1.20	0.20	15.6	3.40

[1] Referencia al Nº de estudio-Nº de medida.
[2] Concentración de Se con el cual se suplementó la dieta.
[3] Número de medidas con la cual se calculó la media de Actividad de GPx.
[4] Medidos en nmol NADPH/min/mg proteína.
[5] Desviación Estándar de la media.

Para los datos del Grupo2-Sangre, luego de realizar un primer MA se revisaron las medidas E44-138 y E6-195 en los artículos originales por ser las que difieren más del resto. No se vio razón aparente para tal diferencia (tuvieron un tratamiento similar al resto). Se realizó un nuevo MA sin dichas medidas cuyo resultado se muestra en la Tabla 9. Ambos Forest Plots revelaban que el estudio E6-39 tiene resultado no significativo, pero el promedio da significativo en ambos casos.

Tabla 9. Resultados del MA Grupo 2 Sangre.

Referencia	Δ Medias[1]	SE[2]	Intervalo de Confianza 95%		% Efecto de Peso[3]
			Límite inferior	Límite Superior	
E6-39	4.2000	2.3377	-5.8585	14.2585	8.6540
E6-40	6.3000	0.7655	4.5347	8.0653	10.8148
E6-41	9.2000	0.6768	7.6394	10.7606	10.8861
E6-42	9.8000	0.8206	7.9717	11.6283	10.7666
E44-136	9.8400	1.8277	6.0495	13.6305	9.4786
E44-137	16.9400	2.0094	12.7727	21.1073	9.1912
E6-196	2.0000	0.3764	1.1614	2.8386	11.0664
E6-197	5.5000	0.8544	3.5297	7.4703	10.7357
E6-198	11.2000	2.2876	6.1028	16.2972	8.7369
E6-200	14.4000	1.7029	10.2331	18.5669	9.6697
[Combinado]					
Promedio	8.7739	1.4537	5.9246	11.6232	

[1] Diferencia entre las medias de Act. GPx (Tratamiento – Control).
[2] Error Estándar.
[3] Porcentaje de peso que tiene la medida en el MA.

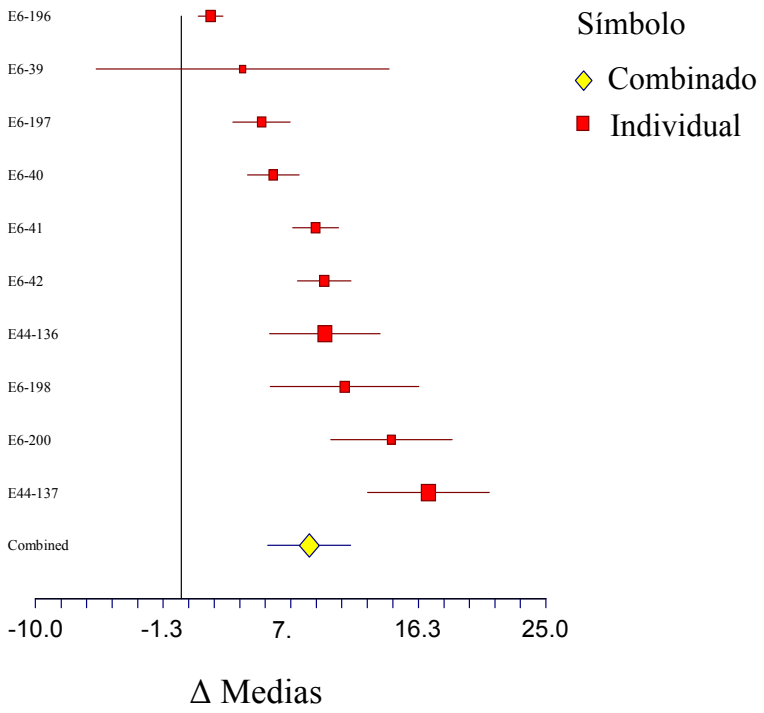


Figura 6. Forest Plot Grupo2-Sangre.

Al comparar los resultados del MA para los Grupos 1 y 2 en sangre (incluyendo todas las medidas y asimismo retirando los *outliers*) se comprueba que para el Grupo1 la actividad de la GPx no aumenta de forma tan elevada como para el Grupo2, lo cual se correlaciona con el diseño del tratamiento. Si bien en ambos casos se suplementó con una dosis Media-Baja de Se, el Grupo1 partía de una dieta basal (con aporte normal de Se) mientras que el Grupo2 partía de una dieta deficiente en Se.

Comparación entre Grupo3-Hígado y Grupo4-Hígado

Tabla 10. Valores Grupo3-Hígado

Referencia[1]	[Se] sup[2] (ppm)	N[3]	Grupo Control		Grupo Suplementado	
			Media[4] Act. GPx	SD[5]	Media[4] Act. GPx	SD[5]
E1-1	1	5	10.81	3.82	115.14	25.56
E22-183	2	4	12.00	2.57	902.00	1.38
E22-184	2	4	33.00	2.09	491.00	1.35
E22-190	2	4	12.00	2.57	770.00	1.23
E22-191	2	4	33.00	2.09	517.00	1.55
E26-160	2	5	8.00	4.00	863.00	120.00
E26-161	4	5	8.00	4.00	786.00	97.00
E26-162	1	5	35.00	15.00	931.00	83.00
E26-163	2	5	35.00	15.00	767.00	123.00
E26-164	4	5	35.00	15.00	786.00	92.00
E26-168	1	5	61.00	29.00	426.00	39.00
E26-169	2	5	61.00	29.00	410.00	31.00
E26-170	4	5	61.00	29.00	398.00	50.00
E3-4	1	10	71.04	25.95	140.16	66.39
E22-7	2	4	12.00	2.57	760.00	1.32
E22-8	2	4	33.00	2.09	515.00	1.70
E26-14	1	5	8.00	4.00	940.00	96.00
E26-15	2	5	8.00	4.00	841.00	175.00
E26-16	4	5	8.00	4.00	800.00	188.00
E26-17	1	5	35.00	15.00	787.00	105.00
E26-18	2	5	35.00	15.00	833.00	79.00
E26-19	4	5	35.00	15.00	852.00	61.00
E26-23	1	5	61.00	29.00	462.00	43.00
E26-24	2	5	61.00	29.00	410.00	41.00
E26-25	4	5	61.00	29.00	438.00	12.00

[1] Referencia al Nº de estudio-Nº de medida.
[2] Concentración de Se con el cual se suplementó la dieta.
[3] Número de medidas con la cual se calculó la media de Actividad de GPx.
[4] Medidos en nmol NADPH/min/mg proteína.
[5] Desviación Estándar de la media.

Se verificaron medidas E1-1 y E3-4 en artículos originales. Se encontró que la medida E3-4 fue realizada con un N=10, mientras que el resto de los estudios fueron realizados con N de entre 4 y 5. La medida E1-1 fue realizada con 21 semanas de tratamiento mientras que el tratamiento en el resto de los estudios duraba entre 6 y 10 semanas. Sin embargo estas diferencias no parecen explicar la diferencia en las medias con respecto al resto. Se realizó

por lo tanto un nuevo MA sin los datos mencionados y el resultado se muestra en la Tabla 11 y Figura 7.
Ambos MA (con y sin *outliers*) arrojaron resultados significativos, tanto para estudios individuales como para el promedio final.

Tabla 11. Resultados del MA para Grupo3-Hígado

Referencia	Δ Medias[1]	SE[2]	Intervalo de Confianza 95%		% Efecto de Peso[3]
			Límite Inferior	Límite Superior	
E22-183	890.0000	1.4585	886.4311	893.5689	4.5223
E22-184	458.0000	1.2440	454.9559	461.0441	4.5224
E22-190	758.0000	1.4246	754.5142	761.4858	4.5223
E22-191	484.0000	1.3010	480.8165	487.1835	4.5224
E26-160	855.0000	53.6954	731.1781	978.8219	4.1654
E26-161	778.0000	43.4166	677.8812	878.1188	4.2825
E26-162	896.0000	37.7200	809.0175	982.9825	4.3390
E26-163	732.0000	55.4148	604.2132	859.7868	4.1441
E26-164	751.0000	41.6869	654.8698	847.1302	4.3003
E26-168	365.0000	21.7348	314.8795	415.1205	4.4599
E26-169	349.0000	18.9842	305.2223	392.7777	4.4746
E26-170	337.0000	25.8496	277.3908	396.6092	4.4345
E22-7	748.0000	1.4446	744.4652	751.5348	4.5223
E22-8	482.0000	1.3470	478.7039	485.2961	4.5223
E26-14	932.0000	42.9698	832.9116	1031.0884	4.2872
E26-15	833.0000	78.2828	652.4795	1013.5205	3.8254
E26-16	792.0000	84.0952	598.0762	985.9238	3.7367
E26-17	752.0000	47.4342	642.6166	861.3834	4.2389
E26-18	798.0000	35.9611	715.0736	880.9264	4.3551
E26-19	817.0000	28.0927	752.2181	881.7819	4.4189
E26-23	401.0000	23.1948	347.5126	454.4874	4.4514
E26-24	349.0000	22.4589	297.2098	400.7902	4.4557
E26-25	377.0000	14.0357	344.6337	409.3663	4.4962
[Combinado]					
Promedio	644.5337	38.9975	568.1000	720.9674	

[1] Diferencia entre las medias de Act. GPx (Tratamiento – Control).
[2] Error Estándar.
[3] Porcentaje de peso que tiene la medida en el MA.

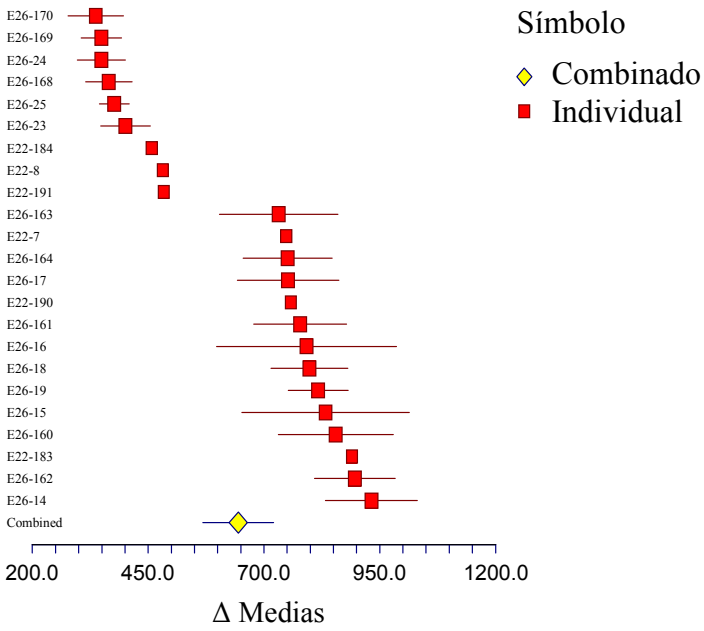


Figura 7. Forest Plot Grupo3-Hígado

Tabla 12. Valores Grupo4-Hígado

Referencia[1]	[Se] sup[2] (ppm)	N[3]	Grupo Control		Grupo Suplementado	
			Media[4] Act. GPx	SD[5]	Media[4] Act. GPx	SD[5]
E26-65	0.2	5	8.00	4.00	700.00	105.00
E26-66	0.2	5	35.00	15.00	662.00	96.00
E26-68	0.2	5	61.00	29.00	373.00	8.00
E31-79	0.1	5	15.38	20.64	630.77	55.03
E42-128	0.2	7	39.09	35.63	3759.00	356.30
E26-222	0.2	5	8.00	4.00	715.00	129.00
E26-223	0.2	5	35.00	15.00	694.00	67.00
E26-225	0.2	5	61.00	29.00	396.00	31.00

[1] Referencia al Nº de estudio-Nº de medida.
[2] Concentración de Se con el cual se suplementó la dieta.
[3] Número de medidas con la cual se calculó la media de Actividad de GPx.
[4] Medidos en nmol NADPH/min/mg proteína.
[5] Desviación Estándar de la media.

Se chequeó la medida E42-128 por ser más del triple del promedio. El grupo deficiente en Se fue alimentado por 8 semanas con una dieta con menos de 0.005 ppm en Se, 4 veces menos que el resto que fuera testeado en hígado. Se realizó un nuevo MA sin este dato. El resultado se muestra en la Tabla 13 y Figura 8, siendo significativo.

Tabla 13. Resultado MA Grupo4-Hígado

Referencia	Δ Medias[1]	SE[2]	Intervalo de Confianza 95%		% Efecto de Peso[3]
			Límite Inferior	Límite Superior	
E26-65	692.0000	46.9915	583.6374	800.3626	13.9220
E26-66	627.0000	43.4534	526.7962	727.2038	14.0537
E26-68	312.0000	13.4536	280.9759	343.0241	14.8005
E31-79	615.3900	26.2843	554.7784	676.0016	14.5692
E26-222	707.0000	57.7183	573.9014	840.0986	13.4787
E26-223	659.0000	30.7050	588.1940	729.8060	14.4576
E26-225	335.0000	18.9842	291.2223	378.7777	14.7183
[Combinado]					
Promedio	560.1685	68.9565	425.0162	695.3207	

[1] Diferencia entre las medias de Act. GPx (Tratamiento – Control).
[2] Error Estándar.
[3] Porcentaje de peso que tiene la medida en el MA.

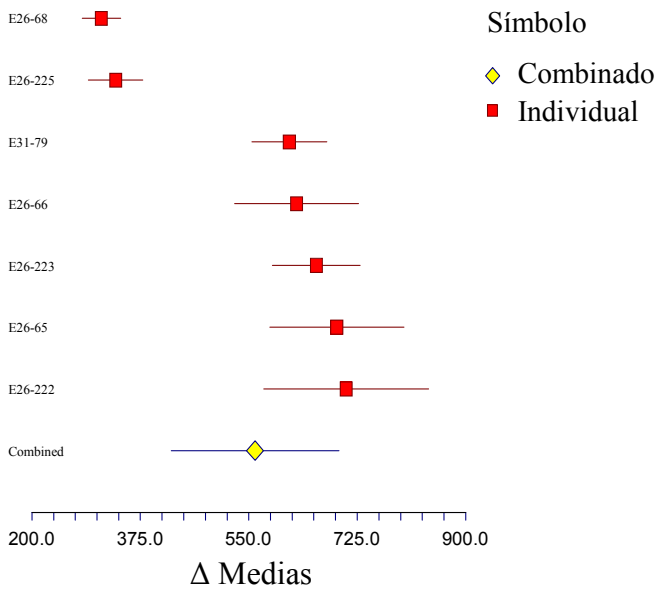


Figura 8. Forest Plot Grupo4-Hígado

Comparando los resultados de ambos MA realizados con todas las medidas, el Gpo 3 tendría menor diferencia de actividad GPx que el Gpo4, lo cual, teniendo en cuenta el diseño del tratamiento y las dosis de suplementación, no sería coherente ya que el Gpo3 tiene una suplementación Alta en Se mientras que el Gpo4 fue suplementado con dosis Media-Bajas (resultado de metanálisis no mostrado).
Sin embargo, comparando los resultados de los MA quitando los datos *outliers*, se observó que el Gpo4 tendría menor diferencia de actividad de GPx que el Gpo3, revirtiendo los resultados anteriores, correspondiéndose en este caso con las dosis suplementadas.

Comparación entre Grupo3-Músculo y Grupo4-Músculo

Tabla 14. Valores Grupo3-Músculo

Referencia[1]	[Se] sup[2] (ppm)	N[3]	Grupo Control		Grupo Suplementado	
			Media[4] Act. GPx	SD[5]	Media[4] Act. GPx	SD[5]
E27-32	1	5	14.73	5.19	102.7	30.32
E27-33	2	5	14.73	5.19	124.0	28.60
E27-34	4	5	14.73	5.19	106.6	26.01
E22-10	2	4	8.00	1.86	114.0	1.86
E26-20	1	5	9.00	2.00	107.0	18.00
E26-21	2	5	9.00	2.00	109.0	8.00
E26-22	4	5	9.00	2.00	92.0	10.00
E22-186	2	4	8.00	1.86	90.0	1.26
E22-193	2	4	8.00	1.86	121.0	1.82
E26-165	1	5	9.00	2.00	128.0	29.00
E26-166	2	5	9.00	2.00	109.0	23.00
E26-167	4	5	9.00	2.00	105.0	25.00

[1] Referencia al Nº de estudio-Nº de medida.
[2] Concentración de Se con el cual se suplementó la dieta.
[3] Número de medidas con la cual se calculó la media de Actividad de GPx.
[4] Medidos en nmol NADPH/min/mg proteína.
[5] Desviación Estándar de la media.

Se realizó el MA utilizando todos los datos arrojando los siguientes resultados.

Tabla 15. Resultados MA Grupo3-Músculo

Referencia	Δ Medias[1]	SE[2]	Intervalo de Confianza 95%		% Efecto de Peso[3]
			Límite Inferior	Límite Superior	
E27-33	109.2700	12.9992	79.2938	139.2462	6.7397
E27-34	91.8700	11.8613	64.5177	119.2223	7.2290
E22-10	106.0000	1.3152	102.7818	109.2182	11.2357
E26-20	98.0000	8.0994	79.3228	116.6772	8.9545
E26-21	100.0000	3.6878	91.4959	108.5041	10.7278
E26-22	83.0000	4.5607	72.4830	93.5170	10.4415
E22-186	82.0000	1.1233	79.2514	84.7486	11.2567
E22-193	113.0000	1.3012	109.8162	116.1838	11.2374
E26-165	119.0000	13.0000	89.0219	148.9781	6.7394
E26-166	100.0000	10.3247	76.1911	123.8089	7.9220
E26-167	96.0000	11.2161	70.1357	121.8643	7.5162
[Combinado]					
Promedio	99.1715	5.3075	88.7690	109.5740	

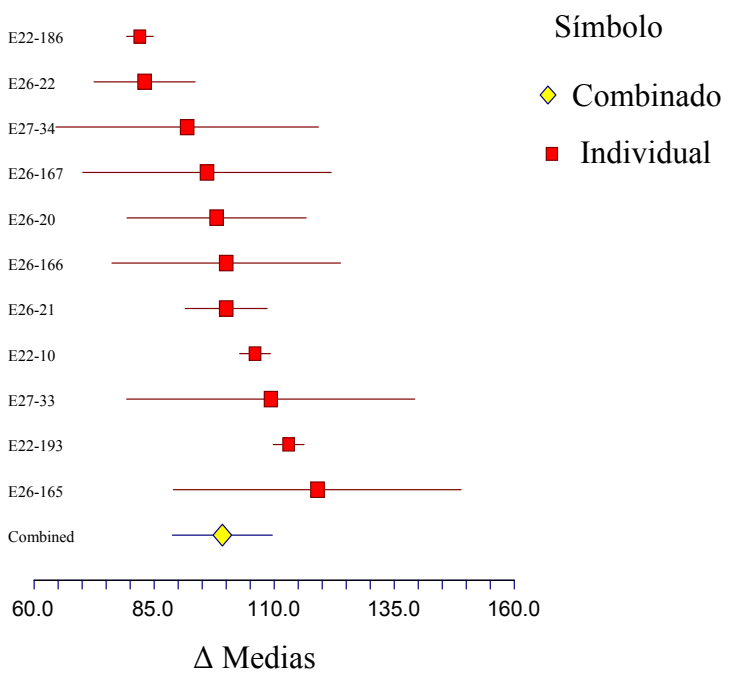


Figura 9. Forest Plot Grupo3-Músculo

Tabla 16. Valores Grupo4-Músculo

Referencia[1]	[Se] sup[2] (ppm)	N[3]	Grupo Control		Grupo Suplementado	
			Media[4] Act. GPx	SD[5]	Media[4] Act. GPx	SD[5]
E27-71	0.01	5	14.73	5.19	17.05	4.47
E27-72	0.03	5	14.73	5.19	21.70	4.47
E27-73	0.06	5	14.73	5.19	45.70	8.68
E27-74	0.10	5	14.73	5.19	62.00	13.42
E26-67	0.20	5	9.00	2.00	87.00	5.00
E31-78	0.10	5	5.52	3.69	122.76	14.18
E26-224	0.20	5	9.00	2.00	97.00	20.00

[1] Referencia al Nº de estudio-Nº de medida.
[2] Concentración de Se con el cual se suplementó la dieta.
[3] Número de medidas con la cual se calculó la media de Actividad de GPx.

Se verificó medida E27-71 por ser *outlier* y tener un SE (error estándar) superior a la medida. El artículo original establece que el dato de esta medida fue con una suplementación de sólo 0.01 ppm de Se.
Se realizó un nuevo MA sin esta medida y el resultado fue el que se detalla en la Tabla 17 y Figura 10. La medida combinada fue significativa así como todos los datos individuales excepto el E27-72.

Tabla 17. Resultados MA Grupo4-Músculo

Referencia	Δ Medias[1]	SE[2]	Intervalo de Confianza 95%		% Efecto de Peso[3]
			Límite Inferior	Límite Superior	
E27-72	6.9700	3.0632	-0.0938	14.0338	16.8971
E27-73	30.9700	4.5228	20.5404	41.3996	16.7887
E27-74	47.2700	6.4348	32.4314	62.1086	16.5873
E26-67	78.0000	2.4083	72.4464	83.5536	16.9325
E31-78	117.2400	6.5527	102.1295	132.3505	16.5728
E26-224	88.0000	8.9889	67.2716	108.7284	16.2215
[Combinado]					
Promedio	61.1303	17.0222	27.7674	94.4932	

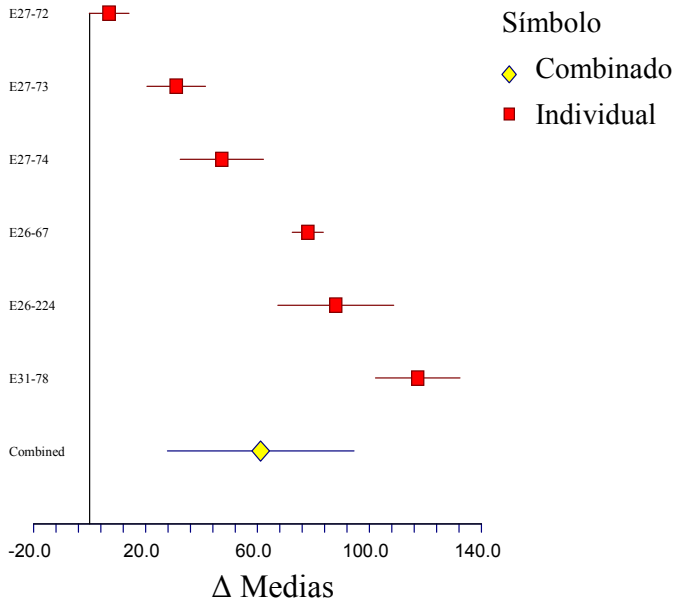


Figura 10. Forest Plot Grupo4-Músculo

Para los MA realizados (con y sin *outliers*) la diferencia de actividad GPx para el Grupo 4 es menor que para el Grupo 3, lo cual se correlaciona con la dosis de suplementación, habiendo sido este último grupo suplementado con mayor dosis.

One Way Análisis de Varianza (ANOVA)

Como complemento del metanálisis se realizó para cada grupo un One Way ANOVA (OWAV) para estudiar el efecto de la Actividad de GPx en función de la dosis de Se suplementado y en función del tipo de Se con el cual se suplementaba la dieta (ya sea orgánico o inorgánico).
Los resultados de dichos análisis se muestran a continuación.

Grupo1-Sangre: OWAV Act. GPx vs dosis Se

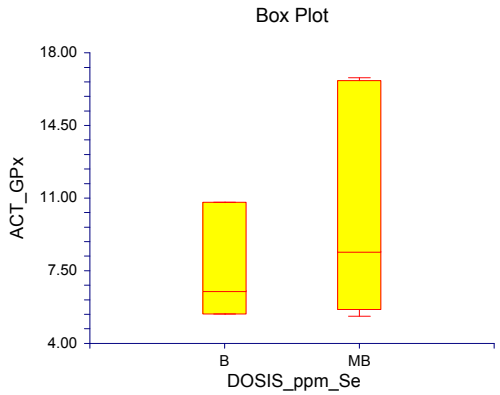


Figura 11. Box Plot, OWAV Grupo1-Sangre. Act. GPx vs Dosis Se (ppm).

Tabla 18. Análisis de Varianza para el Grupo1-Sangre. Act. GPx vs Dosis Se (ppm)

Término de Fuente	DF[1]	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Fuerza (α=0.05)
A: DOSIS_ppm_Se	1	20.80333	20.80333	1.22	0.296027	0.169909
S(A)	10	171.1171	17.11171			
Total (ajustado)	11	191.9204				
Total	12					

* Término significativo con α = 0.05
[1] Grados de libertad

Podemos ver que la Act. GPx en función de la dosis para el Grupo1-Sangre no dio significativo (nivel de probabilidad > α), lo cual se correlaciona con el diseño del tratamiento, ya que el Grupo1 partía de una dieta con suplementación normal de Se.

Grupo1-Sangre: OWAV Act. GPx vs tipo de Se

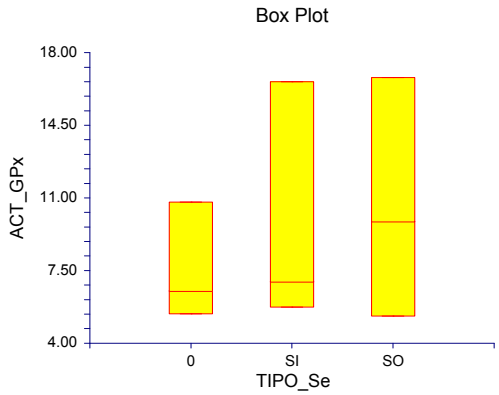


Figura 12. Box Plot Grupo1-Sangre. Act. GPx vs Tipo Se (SO: Fuente de Se orgánico; SI: Fuente de Se inorgánico).

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: ACT_GPx
Term A: TIPO_Se
α=0.050 Término Error =S(A) DF=9 MSE=18.88198 Valor Crítico=3.9485

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
Control	6	7.583333	-
SI	3	9.773334	-
SO	3	10.66	-

Del Test de *Tukey-Kramer Multiple Comparison* se deriva que no hay diferencias significativas entre los distintos grupos, lo cual coincide con el resultado del metanálisis realizado. No hay aumento de Act. GPx por dosis de Se, tanto para SI como para SO.

Grupo2-Sangre: OWAV Act. GPx vs dosis Se

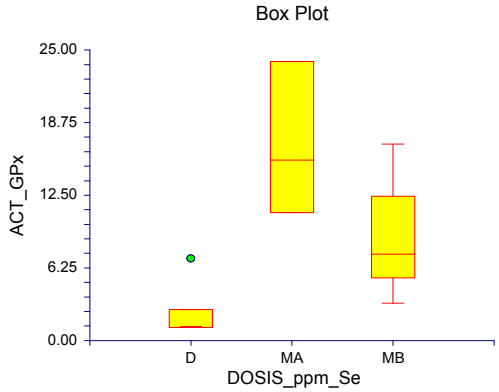


Figura 13. Box Plot, OWAV Grupo2-Sangre. Act. GPx vs Dosis Se (ppm).

Tabla 19. Análisis de Varianza para el Grupo2-Sangre. Act. GPx vs Dosis Se (ppm)

Término de Fuente	DF[1]	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Fuerza (α=0.05)
A: DOSIS_ppm_Se	2	531.7673	265.8836	16.62	0.000100*	0.998320
S(A)	17	271.8843	15.99319			
Total (ajustado)	19	803.6516				
Total	20					

* Término significativo con α = 0.05
[1] Grados de libertad

La Act. GPx en función de la dosis para el Grupo2-Sangre dio significativo (nivel de probabilidad < α), lo cual se correlaciona con el diseño del tratamiento, ya que el Grupo2 partía de una dieta deficiente en Se.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Respuesta: ACT_GPx
Término A: DOSIS_ppm_Se
α=0.050 Término error=S(A) DF=17 MSE=15.99319 Valor Crítico=3.6280

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
D	10	2.372	MB, MA
MB	7	8.928572	D, MA
MA	3	16.86667	D, MB

D: Grupo control (Deficiente en Se)
MB: Suplementación ≤ 0.1 ppm
MA: Suplementación > 0.1 ppm y < 1 ppm

Estos resultados muestran que el grupo deficiente en Se difiere significativamente de ambos grupos suplementados y a la vez los efectos de los grupos suplementados son diferentes en forma significativa entre sí, teniendo el grupo con mayor suplementación un efecto superior.

Grupo2-Sangre: OWAV Act. GPx vs tipo de Se

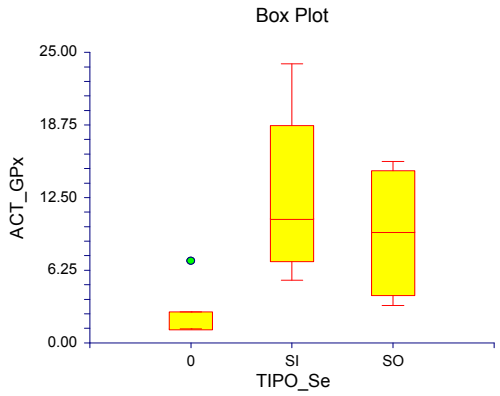


Figura 14. Box Plot Grupo2-Sangre. Act. GPx vs Tipo Se (SO: Fuente de Se orgánico; SI: Fuente de Se inorgánico).

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Respuesta: ACT_GPx
Término A: TIPO_Se

α=0.050 Término Error =S(A) DF=17 MSE=22.45672 Valor Crítico=3.6280

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
Control	10	2.372	SI
SO	4	9.475	-
SI	6	12.53333	Control

Los resultados del test muestran que existe una diferencia significativa entre el grupo control (deficiente en Se) y el Grupo Suplementado (específicamente con SI), lo cual coincide con los resultados del metanálisis realizado. No existe diferencias significativas entre el grupo suplementado con SO y el suplementado con SI.

Grupo3-Hígado: OWAV Act. GPx vs dosis Se

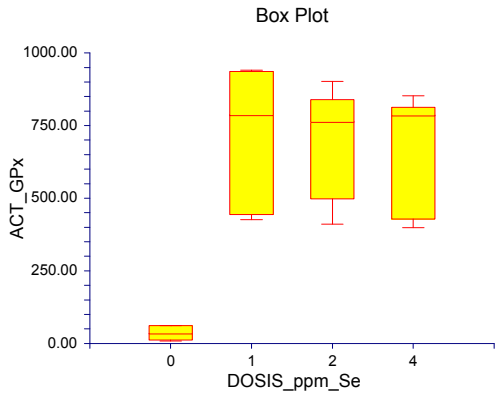


Figura 15. Box Plot, OWAV Grupo3-Hígado. Act. GPx vs Dosis Se (ppm).

Tabla 20. Análisis de Varianza para el Grupo3-Hígado. Act. GPx vs Dosis Se (ppm)

Término de Fuente	DF[1]	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Fuerza (α=0.05)
A: DOSIS_ppm_Se	3	4853144	1617715	79.71	0.000000*	1.000000
S(A)	42	852417.6	20295.66			
Total (ajustado)	45	5705562				
Total	46					

* Término significativo con α = 0.05
[1] Grados de libertad

La Act. GPx en función de la dosis para el Grupo3-Hígado dio significativo (nivel de probabilidad < α), lo cual se coincide con el diseño del tratamiento, ya que el este grupo partía de una dieta deficiente en Se. Esto confirma el resultado del metanálisis realizado.

Grupo3-Hígado: OWAV Act. GPx vs tipo de Se

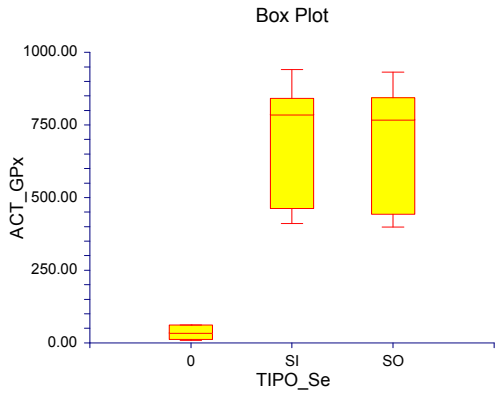


Figura 16. Box Plot Grupo3-Hígado. Act. GPx vs Tipo Se (SO: Fuente de Se orgánico; SI: Fuente de Se inorgánico).

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Respuesta: ACT_GPx
Término A: TIPO_Se
α=0.050 Término Error=S(A) DF=43 MSE=19859.55 Valor Crítico=3.4329

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
Control	23	32.65217	SO, SI
SO	12	670.5833	Control
SI	11	694.3636	Control

Los resultados de este test muestran que existe diferencias significativas entre el grupo control y ambos grupos suplementados, pero no es significativa la diferencia del efecto entre el grupo suplementado con SO y el suplementado con SI.

Grupo4-Hígado: OWAV Act. GPx vs dosis Se

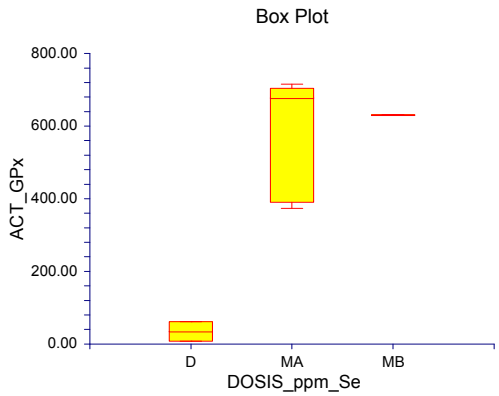


Figura 17. Box Plot, OWAV Grupo4-Hígado. Act. GPx vs Dosis Se (ppm).

Tabla 21. Análisis de Varianza para el Grupo4-Hígado. Act. GPx vs Dosis Se (ppm)

Término de Fuente	DF[1]	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Fuerza (α=0.05)
A: DOSIS_ppm_Se	2	1114417	557208.4	46.58	0.000004*	1.000000
S(A)	11	131578.2	11961.65			
Total (ajustado)	13	1245995				
Total	14					

* Término significativo con α = 0.05
[1] Grados de libertad

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: ACT_GPx
Term A: DOSIS_ppm_Se
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=11 MSE=11961.65 Critical Value=3.8196

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
D	7	31.91143	MA, MB
MA	6	590	D
MB	1	630.77	D

D: Grupo control (Deficiente en Se)
MB: Suplementación con 0.1 ppm de Se
MA: Suplementación con 0.2 ppm de Se

Los resultados del ANOVA para el Grupo4-Hígado, coincidiendo con el resultado del metanálisis, muestran que hay efecto sobre la Actividad GPx al suplementar la dieta con Se. Pero dentro de los dos rangos de suplementación (MB y MA) no existe diferencia significativa.

Grupo4-Hígado: OWAV Act. GPx vs tipo de Se

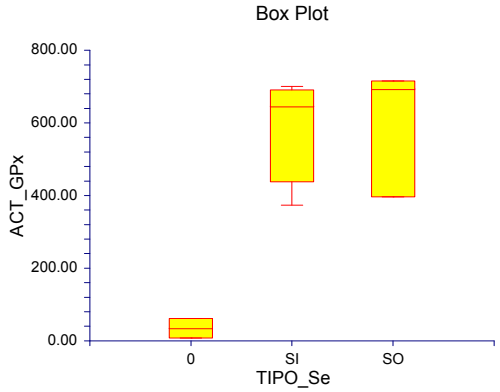


Figura 18. Box Plot Grupo4-Hígado. Act. GPx vs Tipo Se (SO: Fuente de Se orgánico; SI: Fuente de Se inorgánico).

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Respuesta: ACT_GPx
Término A: TIPO_Se
α=0.050 Término error=S(A) DF=11 MSE=12074.88 Valor Crítico=3.8196

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
0	7	31.91143	SI, SO
SI	4	591.4425	0
SO	3	601.6667	0

Este test comprueba la diferencia significativa entre el grupo deficiente en Se y los grupos suplementados, pero muestra que no existe diferencia de efecto entre el grupo suplementado con SI y el suplementado con SO.

Grupo3-Músculo: OWAV Act. GPx vs dosis Se

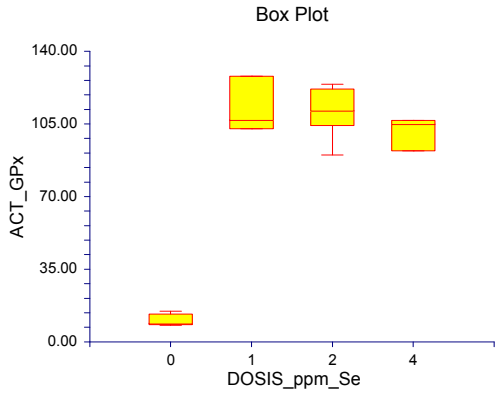


Figura 19. Box Plot, OWAV Grupo3-Músculo. Act. GPx vs Dosis Se (ppm).

Tabla 22. Análisis de Varianza para el Grupo3-Músculo. Act. GPx vs Dosis Se (ppm)

Término de Fuente	DF[1]	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Fuerza (α=0.05)
A: DOSIS_ppm_Se	3	58867.88	19622.63	300.43	0.000000*	1.000000
S(A)	20	1306.319	65.31595			
Total (ajustado)	23	60174.2				
Total	24					

* Término significativo con α = 0.05
[1] Grados de libertad

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Respuesta: ACT_GPx
Término A: DOSIS_ppm_Se
α=0.050 Término Error=S(A) DF=20 MSE=65.31595 Valor Crítico=3.9583

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
0	12	10.1825	4, 2, 1
4	3	101.2	0
2	6	111.1667	0
1	3	112.5667	0

0: Grupo control (Deficiente en Se)
1: Suplementación con 1 ppm de Se
2: Suplementación con 2 ppm de Se
4: Suplementación con 4 ppm de Se

Según los resultados obtenidos para el Grupo3-Músculo se visualiza que existe efecto sobre la Act. GPx al suplementar la dieta con Se, pero este efecto no es significativamente diferente entre las 3 dosis testeadas (1, 2 y 4 ppm).

Grupo3-Músculo: OWAV Act. GPx vs tipo de Se

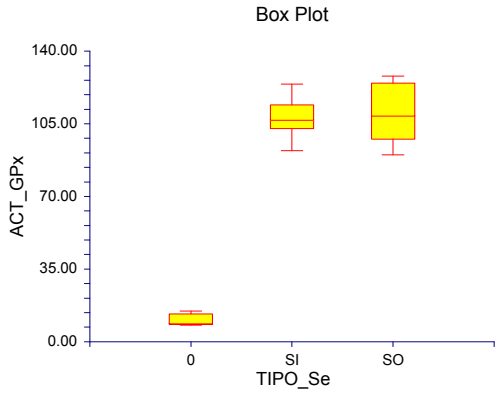


Figura 20. Box Plot Grupo3-Músculo. Act. GPx vs Tipo Se (SO: Fuente de Se orgánico; SI: Fuente de Se inorgánico).

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Respuesta: ACT_GPx
Término A: TIPO_Se
α=0.050 Término Error=S(A) DF=21 MSE=73.04281 Valor Crítico=3.5646

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
0	12	10.1825	SI, SO
SI	7	107.9	0
SO	5	110.6	0

La diferencia significativa entre el grupo deficiente y los grupos suplementados es confirmada con este test, pero al mismo tiempo se observa que no hay efecto diferenciado entre los grupos suplementados con SO y con SI.

Grupo4-Músculo: OWAV Act. GPx vs dosis Se

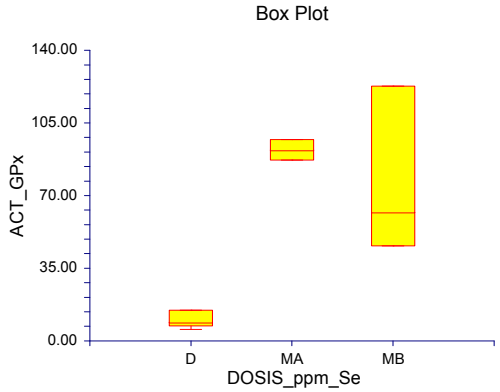


Figura 21. Box Plot, OWAV Grupo4-Músculo. Act. GPx vs Dosis Se (ppm).

Tabla 23. Análisis de Varianza para el Grupo4-Músculo. Act. GPx vs Dosis Se (ppm)

Término de Fuente	DF[1]	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Fuerza (α=0.05)
A: DOSIS_ppm_Se	2	13343.3	6671.649	13.68	0.003816*	0.965484
S(A)	7	3413.611	487.6587			
Total (ajustado)	9	16756.91				
Total	10					

* Término significativo con α = 0.05
[1] Grados de libertad

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Respuesta: ACT_GPx
Término A: DOSIS_ppm_Se
α=0.050 Término Error=S(A) DF=7 MSE=487.6587 Valor Crítico=4.1650

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
D	5	10.596	MB, MA
MB	3	76.82	D
MA	2	92	D

D: Grupo control (Deficiente en Se)
MB: Suplementación con 0.004 ppm de Se
MA: Suplementación con 0.02 ppm de Se

Para Grupo4-Músculo existe una diferencia significativa entre la Act. GPx del grupo deficiente y ambos grupos suplementados, pero no existe efecto diferencial entre el grupo suplementado con 0.02 ppm y con 0.004 ppm.

Grupo4-Músculo: OWAV Act. GPx vs tipo de Se

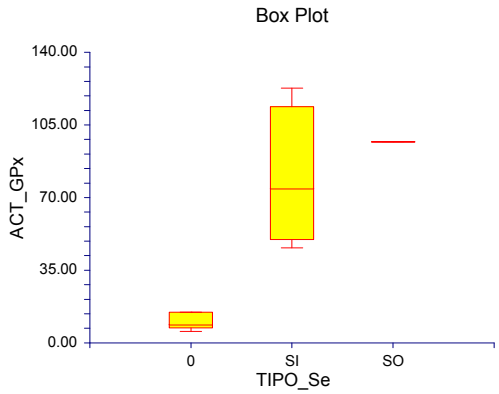


Figura 22. Box Plot Grupo4-Músculo. Act. GPx vs Tipo Se (SO: Fuente de Se orgánico; SI: Fuente de Se inorgánico).

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Respuesta: ACT_GPx
Término A: TIPO_Se
α=0.050 Término Error=S(A) DF=7 MSE=491.6193 Valor Crítico=4.1650

Grupo	Nro de datos	Media	Diferente de los Grupos
0	5	10.596	SI, SO
SI	4	79.365	0
SO	1	97	0

Si bien se confirma que hay efecto sobre la Act. GPx según la dosis de Se, no hay diferencia significativa entre los efectos de los grupos suplementados con SO y con SI.

Sesgo de Publicación

El sesgo de publicación fue evaluado según el gráfico de Embudo o Funnel Plot. Los resultados se muestran en el Apéndice 2.
Para cada grupo se visualiza un sesgo de publicación moderado, el cual es más evidente para el Grupo 4 posiblemente porque el número de datos (N) utilizado para el metanálisis es bajo. Como ya fue explicado en la sección Materiales y Métodos, no fue posible recoger todos los artículos relevantes para el tema, en algunos casos por causa del idioma y en otros por no haber sido posible su localización.

DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos podemos observar que cuando se parte de una dieta basal con aporte normal de Se, no hay efecto de la suplementación, como se vio en el Grupo 1. Esto puede deberse a que con una mejor estabilidad oxidativa, con el aporte necesario de Se y no habiendo sido inducido estrés en el diseño del tratamiento, hay menor necesidad de síntesis de la enzima antioxidante (Leeson et al, 2008; O'Grady et al, 2001). Sin embargo, cuando se parte de una dieta deficiente en Se se ve claramente el efecto de la suplementación en la dieta sobre la actividad de la GPx (Grupos 2, 3 y 4). Sólo en uno de los grupos (Grupo 2) se notó además una diferencia significativa en el efecto al suplementar con distintas dosis de Se, aumentando la actividad enzimática en mayor grado cuando se suplementaba con una dosis mayor. Algunos artículos (Barnes et al, 2009; Mahan et al, 1999) informan que cuando la dieta inicial es deficiente en Se, al aumentar la dosis de suplementación con Se la actividad de la GPx aumenta hasta llegar a una meseta bien definida, por lo que un aumento posterior de la dosis no produciría mayor efecto.
En cuanto a las distintas fuentes de Se en la mayoría de los grupos no se observó diferencias entre la suplementación con Se inorgánico y Se orgánico. Sin embargo en el Grupo 2 el aumento de la actividad enzimática sólo fue significativo cuando fue administrado Se inorgánico. En cuanto a este tema hay mucha controversia entre los distintos autores. Algunos publican que el Se inorgánico es metabolizado con más efectividad por lo que aumenta en mayor grado la actividad de GPx que el Se administrado en forma orgánica (Payne et al, 2005; O'Grady et al, 2001). Otros autores obtuvieron resultados que favorecen la suplementación de Se orgánico sobre el Se inorgánico para un mayor aumento de la actividad enzimática (Mikulski et al, 2009; Jumper et al, 2008).
También se observa una diferencia de efecto entre tejidos para el mismo tratamiento. Los Grupos 3 y 4 revelan que hay un mayor aumento de actividad de GPx para hígado que para músculo en las mismas condiciones. Esto muestra un aspecto importante sobre la formación de selenoproteínas que es la jerarquía en su expresión en diferentes tejidos cuando hay una ingesta insuficiente de Se (Behne, 2001). En futuros trabajos sería interesante evaluar el aumento de la actividad de la enzima asociado a la concentración de Se para cada tejido.
Uno de los objetivos iniciales del presente trabajo era evaluar las diferencias en el aumento de la actividad de GPx en distintas situaciones de estrés. Esto no fue posible por no haberse obtenido suficientes artículos que incluyeran tratamientos con estrés inducido, por lo que sólo fueron evaluadas situaciones sin estrés. Por esto se sugiere a futuro también evaluar las diferencias de efecto que incluyan dichas situaciones de estrés en los tratamientos.

BIBLIOGRAFÍA

Arthur, 2000	Arthur, J. R.,2000, The glutathione peroxidases. Cell. Mol. Life Sci. 57, 1825-1835.
Barnes et al, 2009	Barnes K.M., Evenson J.K., Raines A.M., Sunde R.A., 2009, Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity, J. Nutr. 139:199-206.

Basu, 2000	Funnel Plot, How to Conduct a Meta-Analysis, University of Pittsburg, Super Course: Epidemiology, the Internet and Global Health, http://www.pitt.edu/~super1/lecture/lec1171/index.htm
Behne et al, 1988	Behne D., Hilmert H., Schied S., Gessner H., Elger W., 1988, Biochim. Biophys. Acta 966, 12-21
Behne et al, 2001	Behne D., Kyriakopoulos A., 2001, Mammalian Selenium-Conteining Proteins, Annu. Rev. Nutr. 21:453-473.
Berman et al, 2002	Berman N.G., Parker R.A., 2002, Meta-analysis: Neither quick nor easy, BMC Medical Research Methodology 2:10.
Buckman et al, 1993	Buckman T.D., Sutphin M.S., Eckhert C.D., 1993, A comparison of the effects of dietary selenium on selenoprotein expresion in rat brain and liver, Biochimica et Biophysica Acta, 1163: 176-184.
Bunk y Combs, 1981	Bunk M. J., Combs G. F., 1981, Relationship of selenium-dependent glutathione peroxidase activity and nutritional pancreatic atrophy in selenium-deficient chicks. J. Nutr. 111, 1611-1620.
Chanoine et al, 2004	Chanoine J., Wong A.C.K., Lavoie J., 2004, Selenium deficiency impairs corticosterone and leptin responses to adrenocorticotropin in the rat, Biofactors 20:109-118.
Cochrane Handbook, 2011	Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions; http://handbook.cochrane.org, Versión 5.0.1, 2011.
Cunningham et al, 1987	Cunningham D. L.; Combs G. F.; Saroka J. A., LaVorgna M. W., 1987, Response to divergent selection for early growth of chickens fed a diet deficient in selenium. Poult. Sci. 66, 209-214.
Deagen et al, 1986	Deagen J.T., Butler J.A., Beilstein M.A., Whanger P.D., 1986, Effects of dietary selenite, selenocystine and slenomethionine on selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues, J. Nutr. 117:91-98.
Dean et al, 1986	Dean R.T., Thomas S.M., Garner A., 1986, Free-radical-mediated fragmentation of monoamine-oxidase in the mitochondrial membrane. Role of lipid radicals, Biochem. J. 240:489-494.
DeVore et al., 1983	DeVore, V.R., Colnago G.L., Jensen L.S., Greene, B.E., 1983, Thiobarbituric acid values and glutathione peroxidase activity in meat from chickens fed a selenium-supplemented diet, J. Food Sci. 48:300-301.
Ehret et al, 1989	Ehret, W. J.; Meltzer, D. G. A.; Mulders, M. S.; Collett, F. A., 1989, Erythrocyte glutathione peroxidase activity as an indicator of selenium status in an intensively-managed beef herd, Journal of the South African Veterinary Association 60 (3), 130-133.

Fernández-Ballart et al, 1991	Fernández-Ballart J.D., Vobecky J., Martí-Henneberg C., 1991, Metaanálisis: Síntesis e integración de los resultados de estudios independientes en medicina, Med. Clin. (Barc) 96:382-387.
Flohé, 1978	Flohé L., 1978, Ciba Foundation Symposium, No. 65. pp. 95-122.
Flohé, 1999	Flohé, R., 1999, Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Rad.
Flohé y Maiorino, 2012	R. Brigelius-Flohé, M. Mairoino, Glutathione peroxidases, Biochim. Biophys. Acta (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020
Gabryszuk et al, 2008	Gabryszuk M., Oprzadek, J., 2008, Possibility of improving quality of meat through enrichment of diet in selenium, zinc and vitamin E - on the lamb's meat example, Roczniki Instytutu Przemysu Miesnego i Tuszczowego 46 (3) Warszawa: Instytut Przemyslu Miesnego Tluszczowego, 2008, 15-23.
Girotti, 1998	Girotti A.W., 1998, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J. Lipid. Res. 39:1529-1542.
González-Torres et al, 2000	González-Torres M.C., Betancourt-Rule M., Ortiz-Muñiz R., 2000, Daño oxidativo y antioxidantes, Bioquimia, Vol. 25, Núm. 1, enero-marzo, pp. 3-9.
Greene et al, 1971	Greene B.E., Hsin I., Zipser M.W., 1971, Retardation of oxidative colour changes in raw ground beef. J. Food Sci. 36:940-942.
Gu et al, 1998	Gu QP; Xia YM; Ha PC; Butler JA; Whanger PD, 1998, Distribution of selenium between plasma fractions in guinea pigs and humans with various intakes of dietary selenium, Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology: Organ Of The Society For Minerals And Trace Elements (GMS) [J Trace Elem Med Biol] Mar; Vol. 12 (1), pp. 8-15.
Halliwell et al, 1994	Halliwell B., Cross C.E., 1994, Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress, Environmental Health Perspectives 102 (Suppl. 10): 5-12.
Halliwell y Gutteridge, 1989	Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1989, Free Radicals in biology and medicine, 2nd Edn. Oxford: Clarendon Press.
Halliwell y Gutteridge, 1999	Halliwell B., Gutteridge J. M. C., 1999, Free radical in biology and medicine. 3rd. ed., Oxford University Press. Oxford.
Halliwell y Gutteridge, 2006	Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2006, Free Radicals in biology and medicine, Ed. 4, Clarendon Press, Oxford.
Halliwell y Whiteman, 2004	Halliwell B., Whiteman M., 2004, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, Br. J. Pharmacol. 142:231-255.

Halliwell, 1989	Halliwell B., 1989, Tell me about radicals, doctor: a review, Journal of the Royal Society of Medicine, Vol. 82, December 1989.
Halliwell, 2006	Halliwell B., 2006, Reactive species and antioxidants. Redox Biology is a fundamental theme of aerobic life, Plant Physiology, June 2006, Vol. 141, pp. 312-322.
Halliwell, 2007	Halliwell B., 2007, Biochemistry of oxidative stress, Biochemical Society Transactions Vol. 35, part 5.
Hayes and Strange, 1995	Hayes J. D. and Strange R. C., 1995, Potential contribution of the glutathione S-transferase
Ji et al, 1988	Ji, L.L., Stratman F.W., Lardy H.A, 1988, Antioxidant enzyme Systems in rat liver and skeletal muscle: Influences of Selenium deficiency, chronic training, and acute exercise, Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 263, No.1, May 15, pp. 150-160.
Jotty et al, 2009	Jotty, K., Ojeda M.L., Nogales F., Rubio J.M., Murillo M.L., Carreras O., 2009, Selenium tissue distribution changes after ethanol exposure during gestation and lactation: Selenite as a therapy, Food and Chemical Toxicology 47: 2484-2489.
Juniper et al, 2008	Juniper D.T.; Phipps R.H.; Ramos-Morales E.; Bertin G.; 2008, Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle; J. Anim. Sci. 86:3100-3109.
Kauf et al, 1997	Kauf E., Seidel J., Winnefeld K., Dawczynski H., Häfer R., Stein F., Vogt L., 1997, Selenium in phenylketonuria patients. Effects of sodium selenite administration, Medizinische Klinik (Munich, Germany: 1983) [Med Klin (Munich)] 1997 Sep 15; Vol. 92 Suppl 3, pp. 31-4.
Lam et al, 1993	Lam K.W., Wang L., Hong B.S., Treble D., 1993, Purification of phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase form bovine retina. Curr. Eye Res. 12(1): 9-15.
Leeson et al, 2008	Leeson S., Namkung H., Caston L., Durosoy S., Schlegel P., 2008, Comparison of selenium levels and sources and dietary fat quality in diets for broilers breeders and layer hens, Poultry Science 87:2605-2612.
Mahan et al, 1999	Mahan D.C; Cline T.R.; Richert B., 1999, Effects of dietary levels of Selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum Glutathione Peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality, J. Anim. Sci. 77:2172-2179.
Maiorino et al, 1991	Maiorino M., Chu F., Ursoni F., 1991, GPx-PH is the 18 kDa seleno proteína expressed in human tumor cell lines. J. Biol. Chem. 266(12): 7728-7732

Maiorino et al, 1995	Mariorino M.; Aumann K. D.; Flohe R.; Doria D.; Vandenheuval J. and McCarthy J., 1995, Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). Biol. Chem. Hoppe Seyler. 376, 651-660.
Mikulski et al, 2009	Mikulski D.; Jankowski J., Zdunczyk Z., Wroblewska M., Sartowska K., Majewska T., 2009, The effect of selenium source on performance, carcass traits, oxidative status of the organism, and meat quality of turkeys, Journal of Animal Feed Sciences, 18:518-530.
Moher et al, 2000	Moher D., Cook D.J., Eastwood S., Olkin I. Rennie D., Stroup D.F., 2000, Mejora de la calidad de los informes de los metanálisis de ensayos clínicos controlados: El Acuerdo Quorum Rev. Esp. Salud Pública 74:107-118. Nº 2 Marzo-Abril 2000.
Morrissey et al, 1998	Morrisey P.A., Sheehy J.A., Galvin K., Kerry J.P., Buckley D.J., 1998, Lipid stability in meat and meat products, Meat Sci. 49:S73-S86.
Mueller et al, 2009	Mueller A.S., Fischer J., Most E., Pallauf J., 2009, Investigation into selenium requirement of growing turkeys offered a diet supplemented with two levels of vitamin E, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 93:313-324.
O'Grady et al, 2001	O'Grady M.N.; Monahan F.J.; Fallon R.J.; Allen P., 2001, Effects of dietary supplementation with vitamin E and organic selenium on the oxidative stability of beef, J.Animal Sci. 79:2827-2834.
Omaye et al, 1974	Omaye S.T., Tappel A.L, 1974, J. Nutr. 104:747-753.
Paglia y Valentine, 1967	Paglia D.E., Valentine W.N., 1967, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase, J. Lab. Clin. Med. 70:158-169.
Payne et al, 2005	Payne R.L., Southern L.L., Comparison of inorganic and organic selenium sources for broilers, Poultry Science 84:898-902.
Petrovic et al, 2006	Petrovic V., Boldizarova K., Faix S., Mellen M., Arpasova H., Leng L., 2006, Antioxidant and selenium status of Laing hens fed with diets supplemented with selenite or Se-yeast, Journal of Animal and Feed Sciences, 15:435-444.
Pires Bianchi et al, 1999	Pires Bianchi M., Greggi Antunes, L.M., 1999, Radicais livres e os principias antioxidantes da dieta, Rev. Nutr., Campinas 12(2):123-130, maio/ago., 1999.
Pirsljin et al, 2005	Pirsljin J., Tur S.M., Ljubic B.B., Zdelar-Tuk M., Poljicak-Milas N., 2005, Influence of organic selenium food supplements on age-related changes on antioxidant system in thigh muscle of broiler chicken, Proceedings of the 15th European Symposium on Poultry Nutrition, Balatonfüred, Hungary, 25-29

September, 2005, pp. 539-541.

Ramarathnam et al, 1995 — Ramarathnam N., Osawa T., Ochi H., Kawakishi S., 1995, The contribution of plant food antioxidant to human health, Trends in Food Science & Technology March 1995, Vol. 6.

Rocher et al, 1992 — Rocher C.; Lalanne J. L., Chaudiere J., 1992, Purification and properties of a recombinant sulfur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. Eur. J. Bioch. 205, 955-960.

Rotruck et al, 1973 — Rotruck J. T.; Pope A. L.; Ganther H. E.; Swanson A. B.; Hafeman D. G., Hoekstra W. G.,1973, Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science. 179, 588-590.

Sandoya, 2008 — Sandoya E., 2008, Metaanálisis: fortalezas y debilidades, Rev. Urug. Cardiol. 23:263-275.

Saran et al, 1990 — Saran M., Bors W., 1990, Radical reactions in vivo: An overview. Radiat. Environ. Biophys. 29:249-262.

Sies, 1991 — Sies H., 1991, Oxidative Stress: introduction. In oxidative stress: Oxidants and antioxidants, ed. Sies, H., pp. xv-xxii. Academic Press, London.

Sies, 1995 — Sies, H., 1995, Strategies of antioxidant defense: relations to oxidative stress. In signaling mechanisms from transcription factors to oxidative stress, ed. Packer, L. & Wirtz, K., pp. 165-186. Springer Verlag, Berlin.

Sies, 1997 — Sies H., 1997, Physiological Society Symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, Experimental Physiology 82:291-295.

Sun et al, 2001 — Sun Y., Butler J.A., Whanger P.D., 2001, Glutathione peroxidase activity and selenoprotein W levels in different brain regions of selenium-depleted rats, Journal of Nutritional Biochemistry 12:88-94.

Sunde, 1997 — Sunde R.A., 1997, Selenium, Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements, O'Deel B.L. & Sunde R.A., eds. Marcel Dekker, Inc. NY, p. 493.

Surai, 1999a — Surai, P. F., 1999, Tissue-specific changes in the activity of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. Br. Poult. Sci. 40, 397-405.

Surai, 1999b — Surai, P. F.,1999, Vitamin E in avian reproduction. Poult. Avian Biol. Rev. 10, 1-60.

Tabatabaei et al, 2008 — Tabatabaei N., Jamalian J., Owji A.A., Ramezani R. Karbalaie N. Rajaeifard A.R., 2008, Effects of dietary selenium supplementation on serum and liver selenium, serum malondialdehyde and liver glutathione peroxidase activity in rats consuming thermally oxidized sunflower oil, Food and Chemical Toxicology 46:3501-3505.

Takahashi et al, 1987 — Takahashi K., Avissar N., Whitin J., Cohen H., 1987,

Purification and characterisation of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the cellular enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 256, 677-686.

Tallandini et al, 1996 — Tallandini L.; Cecchi R.; De Boni S.; Galassini S.; Ghermandi G.; Gialanella G.; Liu N.; Moro R.; Turchetto M.; Zhang Y., 1996, Toxic levels of selenium in enzymes and selenium uptake in tissues of a marine fish, Biological Trace Element Research [Biol Trace Elem Res] Jan; Vol. 51 (1), pp. 97-106.

Tanguy et al, 2003 — Tanguy S., Besse S., Ducros V., de Leiris J., Boucher F., 2003, Effect of increased dietary selenium intake on blood and cardiac selenium status during aging in rats, Nutrition Research 23:239-243.

Tessier et al, 1995 — Tessier F.; Hida H.; Favier A.; Marconnet P., 1995, Muscle GSH-Px activity after prolonged exercise, training, and selenium supplementation, Biological Trace Element Research [Biol Trace Elem Res] Jan-Mar; Vol. 47 (1-3), pp. 279-85.

Tian et al, 2001 — Tian Y., Qu N., Zhou Y., Xu J, 2001, Effect of methionine supplementation on the selenium bioavailability in rats fed on grains from Keshan disease endemic area, Wei Sheng Yan Jiu = Journal Of Hygiene Research [Wei Sheng Yan Jiu] 2001 Jan; Vol. 30 (1), pp. 55-7.

Ursini et al, 1985 — Ursini F.; Maiorino M., Gregolin, C., 1985, The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta. 839, 62-70.

Wang et al, 2010 — Wang X., Geng Z., Wang Y., Liu S., Wu Z., 2010, Effects of sources and levels of dietary selenium on the expression level of mRNA of cellular glutathione peroxidase gene in piglets, Chinese Journal of Animal Nutrition 22 (6) Beijing: Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 1630-1635.

Whanger et al, 1988 — Whanger P.D., Butler J.A., Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats, 1988, J. Nutr. 118:846-852.

Yeh et al, 1997 — Yeh, J., Vendeland S.C., Gu Q., Butler J.A., Ou B., Whanger P.D., 1997, Dietary selenium increases selenoprotein W levels in rat tissues, J. Nutr. 127:2165-2172.

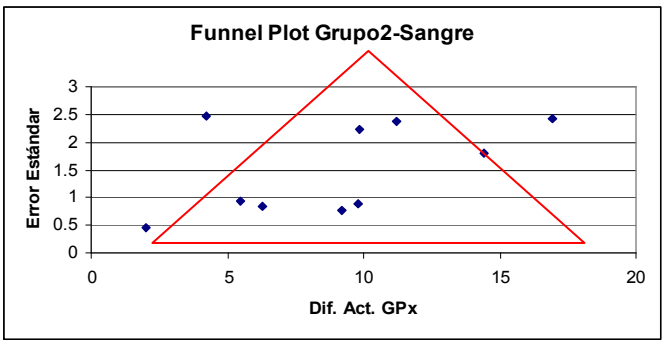
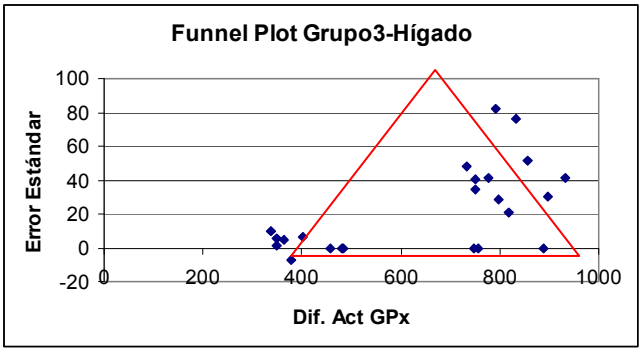
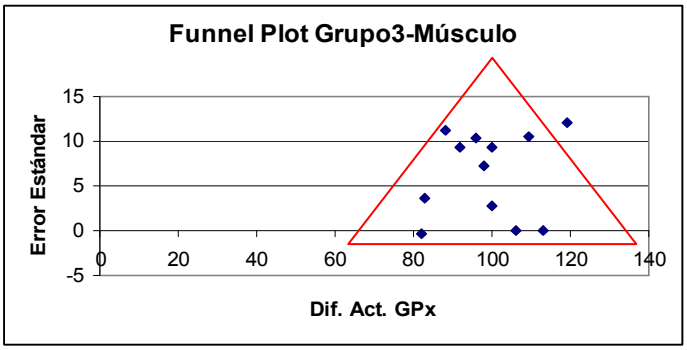
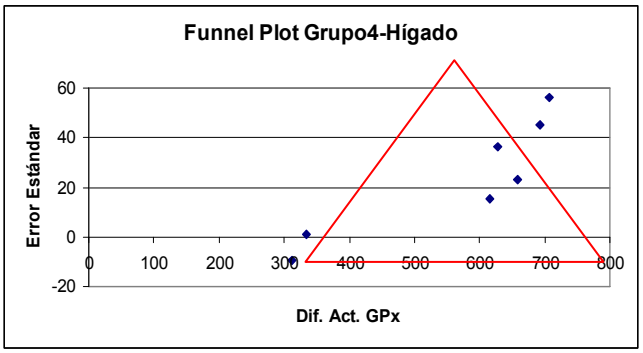
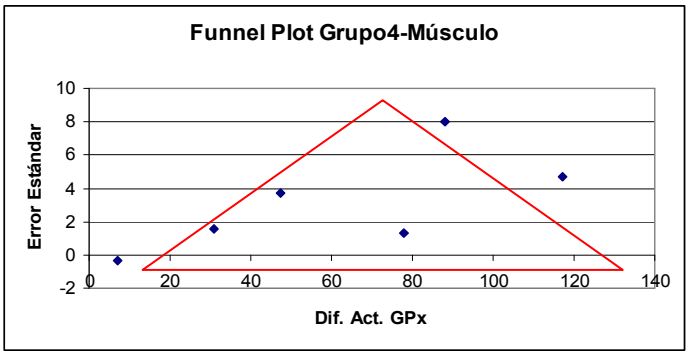
Yoon et al, 2007 — Yoon I., Werner T.M., Butler J.M., 2007, Effect of source and concentration of selenium on growth performance and selenium retention in broiler chickens, Poultry Science 86:727-730.

Zachara, 1991 — Zachara B.A., 1991, Mammalian selenoproteins. J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. 6(3): 137-145.

APÉNDICE 1

Ítems considerados para evaluación de calidad de los estudios a utilizar en el MA. (Adaptado de Berman et al, 2002).

	Fuente de la información
1	¿Fue el artículo publicado en una revista arbitrada?
2	¿Está indicado el propósito del ensayo en la publicación?
3	¿Están los investigadores bien calificados para emprender el estudio?
4	En caso de que sea necesaria información no publicada por el autor, ¿existen problemas para obtenerla o información faltante?
	Financiamiento
5	¿Tenían los investigadores algún interés financiero en el resultado?
	Diseño del estudio
6	¿Está descrito el diseño?
7	¿Es el diseño apropiado para los objetivos del estudio?
8	¿Están claramente definidos los métodos y el tratamiento utilizados?
	Resultado de los estudios
9	¿Están los resultados claramente definidos, incluyendo los métodos de medición?
10	¿Las mediciones de los resultados responden a las preguntas del estudio?
	Controles
11	¿Son los controles comparables con los sujetos de estudio?
	Protocolo del tratamiento
12	¿Fueron seguidos los regimenes para los tratamientos?
13	¿Fue aplicado algún tratamiento concomitante?
	Métodos
14	¿Eran los métodos de laboratorios conocidos como precisos y son todavía considerados válidos?
15	¿Fueron todos los ensayos realizados en el mismo laboratorio usando los mismos métodos?
	Estadísticas
16	¿Están los métodos analíticos claramente descriptos y son apropiados para los datos y el diseño del estudio?
17	¿Está disponible en el artículo o a través del autor el resumen estadístico necesario para el metanálisis?

APÉNDICE 2

Funnel Plots (Gráficos de Embudo)