

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DETERMINACION INDIRECTA DE SELENIO EN RUMIANTES A PASTOREO
MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA EN SANGRE**

por

**Martín AMILIVIA
Oscar DA SILVA**

TESIS DE GRADO presentado como uno
de los requisitos para obtener el título
de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: **MEDICINA VETERINARIA
PRODUCCION ANIMAL**

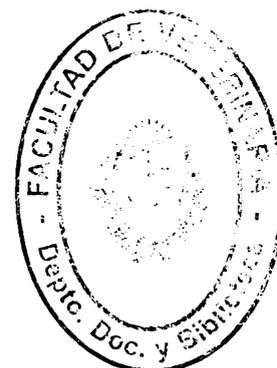
MODALIDAD: TRABAJO DE INVESTIGACION

129 TG
Determinación i
Amilivia, Martín



FVI28252

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2008**

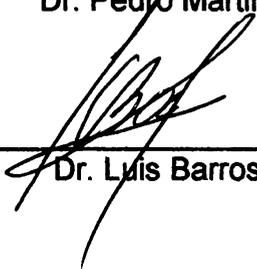


PAGINA DE APROBACION

Presidente de mesa:

Dr. Pedro Martino

Segundo miembro (Tutor):


Dr. Luis Barros

Tercer miembro:

Dra. Analía Pérez

Fecha:

27 / 02 / 2009

Autores:


Br. Martín Amilivia

Br. Oscar Da Silva

AGRADECIMIENTOS

- Dr. Luis Barros, Departamento de Rumiantes y Suinos, Tutor del Trabajo Final.
- Dr. José Luis Ferrari de la ciudad de Treinta y tres, por coordinar y ayudarnos en la realización de los muestreos en el establecimiento “La Serena “, destacando su constante disponibilidad y apoyo.
- Sr. Javier Sanguinetti, encargado del establecimiento “La Serena “y al personal de la misma.
- Dr. Pedro Martino y personal del Laboratorio clínico del centro Hospital Veterinario, por cedernos sus instalaciones para el procesamiento de las muestras.
- Dr. Fernando Dutra, DILAVE Treinta y Tres, por el material brindado.
- Dr. Eduardo G. Eliseche de Laboratorio Agro Insumos (Argentina) por el material brindado.
- Dras. Maria Noel Pérez y Federica Albanel, por la ayuda en las tareas de laboratorio.
- Sr. Fabian Larracharte, por facilitarnos el transporte al establecimiento “La Serena “.
- Agradecimiento especial a Virginia García y Evelyn Pons, y a nuestra familia por el apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADOS Y FIGURAS	IV
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	1
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	2
4. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	5
5. <u>OBJETIVOS</u>	12
6. <u>HIPOTESIS</u>	12
7. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	12
7.1 ENSAYO DE PUESTA A PUNTO Y VALIDACION	12
7.2 PREPARACION DE REACTIVOS	14
7.2.1 Protocolo 1	14
7.2.2 Protocolo2	15
7.2.3 Determinación de hemoglobina y hematocrito	16
7.3 PRINCIPIOS DE LA TECNICA ANALITICA	16
7.4 TRABAJO EXPERIMENTAL	17
7.4.1 Muestreo	17
7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
8. <u>RESULTADOS</u>	18
8.1. PUESTA A PUNTO Y VALIDACION DE LA TECNICA	18
8.1.1. Primer ensayo	18
8.1.2. Segundo ensayo	18
8.1.3. Tercer ensayo	18
8.1.4. Cuarto ensayo	18
8.1.5. Quinto ensayo	19
8.1.6. Sexto ensayo	19
8.2. MUESTREO EXPERIMENTAL	19
8.2.1. Primer muestreo	19
8.2.2. Segundo muestreo	21
9. <u>DISCUSIÓN</u>	24
9.1. PUESTA A PUNTO Y VALIDACION DE LA TECNICA	24
9.2. MUESTREO EXPERIMENTAL	25
10. <u>CONCLUSIONES</u>	28
11. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	29

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
- CUADRO I - Composición de reactivos técnica de laboratorio	15
- CUADRO II - Composición de reactivos del Kit Ransel	16
- CUADRO III - Resultados de los ensayos	18
- CUADRO IV - Resultados de las vacas 1° muestreo	20
- CUADRO V - Resultados de las vaquillonas 1° muestreo	21
- CUADRO VI - Resultados de los novillos 2° muestreo	22
- CUADRO VII - Resultados de las vacas 2° muestreo	23
- CUADRO VIII- Test t muestreo experimental de campo	24

1. RESUMEN

El siguiente trabajo fue diseñado para validar una técnica de diagnóstico para determinar selenio en sangre entera mediante la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GSH-PX) en el Laboratorio de Rumiantes de la Facultad de Veterinaria, en bovinos a pastoreo en el Uruguay. Para validar la técnica se obtuvo sangre entera de bovinos y se comparó con un Kit comercial (Ransel®). Luego se realizaron dos test en ganado raza Hereford de un establecimiento productivo en Treinta y Tres, el primero en otoño con 24 vaquillonas de 1 a 2 años de edad y 10 vacas, siendo estas tratadas con selenio. El segundo test se realizó en invierno con 15 novillos de 1 a 2 años y 10 vacas también tratadas con selenio, obteniéndose por cada animal 10 ml de sangre entera heparinizada. La actividad de GSH-Px en vacas fue de 80% de animales con valores normales por encima de 130 U/g hemoglobina (Hb). En las categorías jóvenes, 50% se encuentra en valores por debajo de 130 U/g de Hb. La diferencia entre animales jóvenes y adultos fue estadísticamente significativa. Según estos resultados es posible recomendar el uso rutinario de la técnica descrita.

2. SUMMARY

This work was performed to validate a diagnostic technique for the determination of selenium in cattle whole blood, by the activity of the enzyme glutathion peroxidase. It was developed at the laboratory of Ruminants from the Veterinary Faculty of Uruguay. The validation of the technique was done in comparing with a commercial kit (Ransel®) using bovine whole blood. After that, two series of analyses were realized in Hereford cattle from a commercial herd placed in Treinta y Tres. First trial was done in autumn with 24 heifers aged between 1 and 2 years old and 10 adult cows previously treated with selenium. Second trial was done in winter on 15 castrated young bulls aged between 1 and 2 years old and 10 adult cows treated also with selenium. Was collected 10 ml of heparinized whole blood for each bovine. Results shown that 80% of the cows had a normal GSH-Px activity with values over 130 U/g Hb. A 50% of the younger categories showed lower results being values under 130 U/g Hb. The differences between young and old animals were statistical significant. According to these results it is possible to recommend the routinely use of this diagnostic technique to detect selenium status of cattle.

3. INTRODUCCION

El selenio (Se) es un elemento traza que fue descubierto por Jons Jacob Berzelius en 1818 (Reilly, 1993), es a su vez un nutriente esencial para el mantenimiento y desarrollo de las funciones del organismo animal, debiendo estar presente en la dieta de los animales domésticos en concentraciones que varían entre 0.1 y 0.3 ppm (N.R.C, 1989).

Rotruck et al (1973), comprobaron un papel bioquímico esencial para el Se, al encontrar que la glutatión peroxidasa (GSH- Px) es una selenoproteína, cuya actividad en los eritrocitos guarda relación directa con la concentración sanguínea de Se en las distintas especies animales, constituyendo un método valioso para el diagnóstico de la carencia de Se y poder determinar el estado de este elemento en los tejidos. Esta enzima de los eritrocitos tanto de bovinos como de ovinos contiene 4 átomos gr. de Se/mol de enzima (Sunde y Hoekstra, 1980).

La GSH-Px es una enzima que participa en la protección de las membranas celulares y del contenido lipídico de los organelos, del daño por peroxidación, destruyendo e inhibiendo agentes peróxidos endógenos, actuando en conjunción con la vitamina E en el mantenimiento de estas membranas. El peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos son capaces de causar desnaturalización de proteínas celulares esenciales lo que provoca degeneración y necrosis tisular (Board y Peter 1976). La GSH-Px cataliza la ruptura del peróxido de hidrógeno y ciertos hidroperóxidos lipídicos producidos por el glutatión (GSH) durante los procesos cíclicos del redox. Esta dependencia de la actividad de la GSH-Px sobre la presencia de Se se explica por la interrelación del Se, Vitamina E y aminoácidos que contienen azufre en los animales. Los aminoácidos azufrados pueden ser precursores del glutatión actuando como sustrato de la GSH-Px manteniendo así grupos sulfhídricos en la célula (Little y col., 1970; Radostits y col., 2002).

Pueden existir grandes variaciones de la concentración sérica de selenio y de la actividad de la glutatión peroxidasa en bovinos que pastan forraje con diferentes concentraciones de selenio dentro de la misma zona geográfica.

Existen factores que reducen la disponibilidad de selenio en el suelo para las plantas, como es el caso del pH del suelo, que cuando es alcalino favorece la absorción de selenio por las plantas. Otro factor es la presencia de un nivel elevado de azufre, el cual compite por los sitios de absorción con el selenio, tanto en las plantas como en los animales, reduciendo así la biodisponibilidad del mismo (Han, 2000).

También encontramos variaciones entre las plantas en cuanto a su capacidad para absorber selenio, caso de las leguminosas que absorben mucho menos selenio que las gramíneas. Las condiciones estacionales y climáticas también influyen en el contenido de selenio en los pastos, siendo más bajo el contenido en la primavera y cuando llueve con intensidad. De este modo un suelo deficiente puede producir un pasto pobre en selenio si es fertilizado intensamente con fosfatos, lo que eleva su

contenido de sulfato, en presencia de lluvias y pasturas tupidas y dominadas por el trébol como es probable que ocurra durante la primavera (Ortuño, 1996).

El selenio forma parte de muchas proteínas como lo son las selenoproteínas del músculo, la selenoflagelina, la proteína de transporte de selenio y las enzimas bacterianas formadoras de deshidrogenasa y glicín-reductasa. También facilita significativos cambios en el metabolismo de muchos fármacos y xenobióticos, impidiendo así la toxicidad de muchos metales como el arsénico, cadmio, mercurio, cobre, plata y plomo (Radostits y col., 2002).

Existe una gran variedad de manifestaciones clínicas de la carencia de Se en las distintas especies animales productivas. En los rumiantes se destaca la distrofia muscular nutricional enzoótica (DMN) que se manifiesta más comúnmente en terneros y corderos jóvenes. La DMN es una enfermedad degenerativa de los músculos estriados que se presenta sin intervención neurológica. Existen dos síndromes principales, una forma aguda, la distrofia del miocardio en animales jóvenes y una forma sub-aguda, la distrofia muscular esquelética en animales mayores de un año. En los corderos, esta enfermedad es más común en crías de 3 a 6 semanas de edad, aunque puede presentarse desde el nacimiento hasta los doce meses (Radostits y col., 2002).

En nuestro país se ha comprobado la Distrofia Muscular Nutricional (DMN) en rodeos de carne y leche de las zonas Este y Sur. Estos fueron casos esporádicos en terneros en los departamentos de Colonia y San José, en Salto (1974) un solo caso en un carnero y la forma enzoótica en los departamentos de Treinta y Tres (1972), Maldonado (1974) y en vacas Holando en explotación lechera con parición estacional en San José (Podestá y col., 1976). Los establecimientos estudiados tenían una superficie que oscilaba entre 500 y 1500 Hás, con una alta fertilización con hiperfosfato que alcanzaba valores de 1000 a 1200 Kg/Há y presentaban suelos ácidos en los potreros problema.

Se destaca que las praderas son distrofogénicas por el bajo tenor de Se (menor a 0.1ppm/kg de materia seca). Dentro de las especies predominaban las leguminosas, variando en la composición desde un 75% de trébol blanco (*Trifolium repens*) y trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*), 60% de trébol carretilla (*Medicago polymorfa*) y en las gramíneas, predominaban el Ray grass (*Lolium perenne*) y Festuca (*Festuca pratensis*).

En los resultados obtenidos por Podestá se determinó que la presentación de la enfermedad se daba desde fines del otoño hasta fines de la primavera, presentándose en terneros de ambos sexos a partir del destete.

Los datos climatológicos son coincidentes en todos los casos, precedida de alta pluviosidad, que llega a superar en un 100% la media de años anteriores en que no se presentaron casos. Se determinó la disminución de la luminosidad y cambios bruscos de temperatura, por ejemplo heladas, como factores coadyuvantes en el agravamiento de la sintomatología.

Los animales más afectados fueron los terneros de mejor desarrollo, los machos más que las hembras. A su vez estos animales compartían la misma pradera con terneros que aún no habían sido destetados, los cuales no presentaban sintomatología

alguna. Entre los síntomas descritos se destacó, apetito escaso y flancos hundidos en la totalidad de los animales. La sintomatología en un primer momento es respiratoria, asociada a debilidad general, adelgazamiento progresivo y diarreas. Además en todos los casos se observó, dificultad para incorporarse, actitud de rodillas, posiciones anómalas, de las cuales salen al levantarles la cabeza y ayudarlos, la dificultad en la marcha es perceptible, notándose un ligero balanceo y leve claudicación simétrica del tren posterior, con rotación y acercamiento de garrones. En dichos casos la evolución de la enfermedad fue crónica, oscilando entre 5 meses y 1 año.

Con respecto a los exámenes colaterales, podemos observar que la enzima más correlacionada con el daño muscular es la creatin-fosfoquinasa (CPK). En uno de los grupos experimentales se constató que los niveles séricos de CPK se redujeron notablemente en los animales tratados con Se y vitamina E y aumentaron en los animales control.

El valor de hematocrito resultó ligeramente disminuido, siendo la media 31,4% cuando lo normal es 35%. En el caso de la hemoglobina se produjo una marcada disminución, con una media de 5,76 g/dl cuando lo normal es de 10 a 12 g/dl.

Análisis de pasturas en dos praderas distrofogénicas resultaron que en invierno presentaban un tenor de Se de 0.090 ppm de materia seca y en la primavera descendieron a 0.056 a 0.45 ppm (de materia seca).

En este trabajo se concluyó que en el Uruguay donde la DMN se presenta después del destete no es necesario modificar el manejo si se administran 10 mg de Se vía subcutánea a los tres meses de edad, repitiendo cada tres meses esta dosis como forma preventiva. Con respecto a los adultos se recomienda dosis de 20 a 30 mg de Se y 1500 mg de vitamina E por vía subcutánea, un mes antes del parto. También podría ser efectiva la administración de sales minerales con 26 ppm de Se como método de prevención.

Se puede recurrir a la fertilización con abonos selenizados calculando una cantidad no superior a 11 grs de selenito de sodio por hectárea, lo cual es suficiente para cubrir las necesidades de un período de un año.

En caso de no disponer de medicamentos específicos, pasar los terneros a campo natural o sin leguminosas, ha sido la medida más eficaz, aunque la recuperación es más lenta (Podestá y col., 1976).

Considerando la presencia de esta patología en el Uruguay, nos proponemos a validar una técnica de diagnóstico, determinando así la concentración de Se en bovinos en condiciones de pastoreo mediante la actividad de la enzima GSH-Px.

4. REVISION BIBLIOGRAFICA

El selenio es un micronutriente esencial para los animales rumiantes y no rumiantes, y se han podido observar síndromes de deficiencia tales como: crecimiento defectuoso, degeneración muscular, cardiomiopatía, degeneración hepática y disturbios reproductivos; entre otros (Radostits y col., 2002).

La función biológica del Se más antiguamente conocida es la asociada a la vitamina E, con actividad antioxidante y antiinflamatoria y las principales interrelaciones biológicas de este microelemento son con el azufre (macronutriente) y con micronutrientes, tales como: Cu, Zn, vitaminas E y C. Algunas interrelaciones fueron descubiertas recientemente, entre las que la vitamina C promueve la absorción intestinal de Se e incrementa su incorporación en la GSH-Px, y que el Zn afecta la distribución tisular del Se (Combs y Combs, 1986).

La mayoría de los compuestos hidrosolubles (selenitos, selenatos y organocompuestos) están listos para ser absorbidos en un 80–90 % en el tracto gastrointestinal de los monogástricos. En los rumiantes este valor se ve reducido a un 30-35 % debido a la reducción del selenito a selenio elemental por acción de la microflora ruminal (Eliseche, 2005).

La concentración de Se varía mucho en las plantas según sea el contenido del suelo y la especie vegetal. La actividad sanguínea de GSH-Px está correlacionada con la concentración de Se tanto en la sangre y plasma del animal así como en la pradera, lo que demuestra que exista una dependencia de la actividad enzimática del aporte de Se a partir de la dieta (Ceballos y col., 1999).

Algunas zonas se presentan con carencias mientras que en otras regiones se evidencian suelos seleníferos en los que pueden acumularse niveles tóxicos en los forrajes. Tal es el caso de *astrágalus* sp, especie acumuladora de Se que puede llegar a acumular niveles superiores a 300 mg Se/kg MS, considerado tóxico (N.R.C., 1989).

Por otra parte las elevadas tasas de crecimiento de los forrajes como consecuencia de la fertilización del suelo con nitrógeno y fosfato, determinan una dilución de este micronutriente en la planta. También se reconoce menor concentración de Se en forrajes cultivados en suelos arenosos vs en suelos más pesados.

Bajo la denominación de vitamina E se engloban una serie de compuestos activos estrechamente relacionados. Se conocen 8 formas naturales de la vitamina, que pueden clasificarse en dos grupos, según la cadena lateral de la molécula sea saturada o no. Dentro de las formas insaturadas, solo la forma α parece tener actividad vitamínica. El α -tocoferol, como es su nombre completo, es muy abundante en los forrajes verdes y tiernos, mientras que las hojas contienen más vitamina E que los tallos. Los granos de cereales también son ricos en vitamina E, aunque sus niveles descienden notablemente cuando son almacenados y aumenta su humedad. Se considera que la función bioquímica de la vitamina E es antioxidante, previniendo el daño oxidativo de los lípidos sensibles de la membrana al disminuir la formación de hidroperóxidos.

A su vez ejerce una función central en la protección de las membranas celulares contra la lipoperoxidación, de las membranas ricas en lípidos insaturados, como las membranas de las mitocondrias, del retículo endoplásmico y del plasma.

De esta forma podemos determinar que la vitamina E impide la formación del ácido hidroperóxido graso, que los aminoácidos que contienen azufre son precursores de la GSH-PX y el selenio, que forma parte de la enzima GSH-Px interviene en la

destrucción de peróxidos, entonces se concluye que dichos nutrientes producen un efecto bioquímico similar, esto es, una disminución de la concentración de peróxidos o de productos inducidos por estos en los tejidos (McDonald y col., 1993).

Las patologías debidas a la carencia de selenio tienen distribución mundial, sin embargo, el interés biológico del mismo no fue desarrollado hasta 1957, en que se descubrió que juega un papel fisiológico esencial, al mismo tiempo que puede ser un tóxico para los animales superiores. Schwartz y Foltz en 1957, demostraron que la necrosis hepática manifestada en ratas con avitaminosis E, puede ser prevenida mediante suplementación de Se.

Existe una gran variedad de manifestaciones clínicas de la carencia de Se en las distintas especies animales productivas destacándose la DMN en rumiantes jóvenes. Esta enfermedad se presenta en todas las especies siendo más importante en terneros, corderos y cabritos en crecimiento rápido, que nacen de madres que se alimentan con dietas escasas en Se y vitamina E durante períodos prolongados, por lo general durante el invierno. Los forrajes y cereales desarrollados en suelos derivados de rocas de origen reciente (deficiente en Se), casi siempre poseen un contenido bajo de este nutriente (menor a 0.1 mg/kg MS). Los suelos ácidos también producen forrajes deficientes en Se y son los alcalinos los que favorecen la absorción de este mineral por las plantas. Asimismo una concentración elevada de azufre que compite con el Se por el sitio de absorción tanto en los vegetales como en el animal, reduce la disponibilidad de Se. Los animales afectados por la forma aguda de la DMN pueden morir de forma súbita, sin síntomas previos, especialmente después del ejercicio. En algunos casos en terneros, se puede observar un comienzo brusco de los síntomas con embotamiento e insuficiencia respiratoria grave, acompañada de secreción nasal sanguinolenta y espumosa. Los terneros y corderos afectados, comúnmente adoptan el decúbito lateral y pueden ser incapaces de colocarse en decúbito esternal, aún cuando se les ayude. La actitud mental es normal y los terneros afectados están sedientos y pueden deglutir a menos que la lengua esté afectada, presentan taquicardia (150 a 200/minuto) y su temperatura es normal. Los animales enfermos generalmente mueren de 6 a 12 hs después de la aparición de los signos, a pesar del tratamiento. En los brotes de la enfermedad se puede alcanzar se puede alcanzar hasta el 15% de morbilidad y la mortalidad puede ser del 100% (Underwood, 1983).

La forma sub-aguda es conocida como enfermedad del músculo blanco en terneros y como enfermedad del cordero rígido en estos últimos (Distrofia muscular nutricional enzoótica).

Se ha reconocido la enfermedad más comúnmente en terneros menores a un año, en crecimiento rápido, bien alimentados, poco después de un ejercicio desacostumbrado.

Es una enfermedad de distribución mundial siendo más importante en Reino Unido, Estados Unidos, Europa, Canadá, Australia y Nueva Zelanda. Los signos más llamativos son la debilidad y temblor de los miembros con la incapacidad para mantenerse en pie, acompañándose en los terneros de movimientos rotacionales de los corvejones y en los corderos se destaca la marcha netamente rígida denominada

paso de ganso. A la palpación las masas musculares dorsolumbares, glúteas y de los hombros, suelen estar hinchadas bilateralmente y tener mayor firmeza de lo normal. En muchos casos se puede observar la participación en el proceso de los músculos intercostales y diafragma, produciendo disnea de tipo abdominal y puede haber fiebre transitoria debido a los efectos pirógenos de la mioglobina (Radostits y col., 2002).

A la necropsia, el aspecto macroscópico e histológico de las lesiones del músculo es absolutamente constante, pero su distribución varía ampliamente en los diferentes animales. Los grupos de músculos esqueléticos afectados son siempre simétricos, con lesiones más aparentes en los músculos de la nalga y espalda. En los músculos afectados, incluido el diafragma, se observan zonas grisáceas o blancas de degeneración con aspecto de carne de pescado. A veces adoptan disposición en bandas o estrías que interesan a varios grupos de fibras musculares y que discurren a lo largo de un músculo de centro aparentemente normal, o se presentan como estructuras limitantes periféricas en torno a un núcleo de músculo también normal. El músculo afectado es edematoso y friable y en ocasiones está calcificado. A menudo, ocurre neumonía secundaria cuando están afectados los músculos de la faringe y tórax (Podestá y col., 1976).

En los casos en que está afectado el miocardio, se aprecian fácilmente áreas blancas de degeneración, sobre todo sub-endocárdicas en el ventrículo izquierdo en terneros y en ambos ventrículos en los corderos. Desde el punto de vista histológico, las lesiones musculares no son inflamatorias; a la degeneración hialina, sucede necrosis de coagulación. Todas estas manifestaciones son provocadas porque las dietas carentes en Se permiten la lipoperoxidación tisular extensa que provoca degeneración hialina y calcificación de las fibras musculares. Con el tratamiento los animales muestran mejoría después de algunos días y en un período de 3 a 5 días son capaces de levantarse y caminar sin ayuda (Radostits y col., 2002).

En los suinos, la deficiencia de selenio y vitamina E, también se manifiesta por un grupo de enfermedades que comprenden, la enfermedad del corazón morado, hepatitis dietética, distrofia muscular nutricional, hipersensibilidad al hierro en los lechones y quizás úlceras esófago-gástricas. La enfermedad del corazón morado y la hepatitis dietética son las que revierten mayor importancia en los suinos, mientras que la diátesis exudativa y la distrofia muscular acompañan generalmente a la hepatitis. Se presentan en forma natural en cerdos en crecimiento rápido, generalmente en el período posterior al destete (3 semanas a 4 meses). Los cerdos, usualmente reciben dietas deficientes tanto de Se como en vitamina E y a su vez con una alta concentración de ácidos grasos insaturados, como ser aquellas que contienen mezclas de soja y maíz con alto contenido de humedad (Eliseche, 2005).

La enfermedad del corazón morado, es una de las formas más frecuentes de deficiencia de selenio y vitamina E en cerdos. Se presenta más comúnmente en cerdos de engorde en crecimiento (60 a 90 kg), cuyo estado es excelente y que son alimentados con dietas altas en energía y bajas en selenio y vitamina E. Pueden ocurrir brotes de la enfermedad en los que se afecta el 25% de los cerdos

susceptibles y la tasa de mortalidad es del 90% aproximadamente. La enfermedad se ha presentado también en lechones y cerdas adultas. Los cerdos afectados por la enfermedad del corazón morado o microangiopatía, comúnmente aparecen muertos y sin signos premonitorios. Cuando están vivos, los animales muestran una disnea grave, cianosis, decúbito y una marcha forzada, pudiendo ocurrir la muerte de forma súbita. El stress, malas condiciones climáticas o el transporte, pueden precipitar más muertes agudas.

La hepatitis dietética es menos común que la enfermedad del corazón morado, aunque las características epidemiológicas son similares. Afecta crías en crecimiento de hasta 3-4 meses de edad. En este caso la mayoría de los animales también aparecen muertos, en algunos casos se puede observar disnea, depresión, vómitos, diarrea, tambaleos y a veces se observa ictericia.

A la necropsia en los casos de microangiopatía, el cadáver se halla en buen estado. Todas las cavidades contienen líquido y restos de fibrina. Hay hepatomegalia, con el aspecto característico de nuez moscada a la superficie del corte. Los pulmones están edematosos y el pericardio se encuentra ocupado con fibrina. También es común un notable enrojecimiento de la mucosa gástrica. Histológicamente la lesión característica es la congestión miocárdica diseminada, hemorragia y degeneración parenquimatosa y en algunos casos se observa lisis de la materia blanca cerebral.

En la hepatitis dietética el hígado aparece de aspecto moteado, como mosaico en sus lóbulos. Por examen histológico se aprecia distribución lobulillar típica de hemorragia, degeneración y necrosis.

En la distrofia muscular de los suinos, se destaca la distrofia muscular bilateral, con degeneración de Zenker. Hay hialinización, pérdida de las estrías y fragmentación de las miofibrillas (Radostits y col., 2002)

En Nueva Zelanda se ha dado el nombre de "enfermedades con respuesta al selenio", a un grupo de padecimientos que responden favorablemente a la administración estratégica de este elemento. Dichas enfermedades incluyen desmedro de los corderos y terneros en pastoreo, infertilidad en ovejas y diarreas en terneros mayores y ovejas en lactación. No se conoce la patogenia de estas enfermedades sensibles al selenio, pero parece ser que la deficiencia de este es solo marginal. El desmedro se observa en corderos y terneros en pastoreo tanto de carne como de leche, ocurre en todas las edades y particularmente en otoño e invierno.

Disminuye la tasa de crecimiento, da menor producción de lana y también puede observarse diarrea crónica. Ha recibido en Nueva Zelanda, especial atención, en donde la respuesta a la administración del metal ha sido espectacular, a diferencia de lo que sucede en Australia, en donde la enfermedad ha sido reconocida, pero la respuesta al tratamiento no es satisfactoria. Además en estas zonas existen estudios que demuestran que la administración oral de selenio, en corderos, da un mayor peso desde el destete al año de vida y también un mayor peso del vellón (Radostits y col., 2002).

En un ensayo realizado en Valdivia al sur de Chile a finales del otoño de 2000, se vieron diferencias en las ganancias de peso, siendo mayor entre un rebaño tratado con selenito de sodio y otro control sin tratamiento el cual tenía un nivel bajo de actividad enzimática sanguínea de la GSH-Px (Oblitas, 2000).

Wichtel y col. (1994), sostienen que aún no está completamente establecida la razón por la que la deficiencia de Se en animales a pastoreo provoca un retardo en el crecimiento de los mismos, aunque no se observan signos de DMN. Por otra parte la tasa de crecimiento de estos animales aumenta al suplementar con Se, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo en la cual no estaría involucrado un metabolismo anormal de peróxidos y por lo tanto es independiente de la enzima GSH-Px.

La deficiencia de Se provoca alteraciones en la reproducción de machos y hembras en todas las especies domésticas. La suplementación con Se puede prevenir alteraciones en la reproducción en cerdos, que afectan al tamaño de las camadas, tasa de concepción en el primer servicio de cerdas jóvenes y mortalidad de los lechones. Estos trastornos se presentan cuando los alimentos son naturalmente pobres en Se y también son bajas las reservas tisulares de los animales. Se desconoce el sitio exacto y el mecanismo de acción del Se en el ciclo reproductor de la hembra aunque parece posible que ejerza un efecto directo en el momento de la concepción o determine una mortalidad embrionaria muy precoz (Underwood, 1983).

En Nueva Zelanda una mortalidad embrionaria de las 3 a 4 semanas post-concepción, es decir en el momento de la implantación, se ha considerado como causa de infertilidad en ovejas; en algunas zonas puede alcanzar el 30% de infertilidad y las pérdidas de corderos son elevadas.

La fertilidad de las ovejas mejoró mediante la administración de 5 mg de Se bajo la forma de selenito sódico por boca antes del apareamiento y con una dosis similar un mes antes del parto se evitaron las muertes de los corderos (Underwood, 1983).

La suplementación paralela con vitamina E o selenio ha demostrado disminuir el grado de daño oxidativo. Precisamente, la importancia del manejo nutricional en relación con el estrés oxidativo quedó evidente en un estudio realizado en ganado ovino (Daniels, 2000). En el mismo, se pudo constatar que la administración de dietas ricas en energía al final de la preñez, unida a una suplementación vitamínico-mineral que no se modificaba en función del estado fisiológico, producía un descenso acusado en los niveles de la enzima glutatión peroxidasa. No se habló entonces del término estrés oxidativo, sino que señalaron los riesgos potenciales derivados de la administración de una dieta rica en grasa sobre la salud de la hembra.

En bovinos la deficiencia de Se ha sido estudiada como causa de retención de placenta y de inferior índice reproductivo en ganado lechero. La suplementación de selenito sódico y vitamina E un mes pre-parto puede reducir la incidencia de retención de placenta a menos del 10%, además de evitar pérdidas por nacimiento de terneros prematuros, débiles o muertos en regiones de California y redujo la incidencia de retención de placenta en los rebaños. También tiene un impacto benéfico en el puerperio, reduciendo el número de días post parto que se necesitan para que el útero vuelva a su tamaño normal y se reduzca la incidencia de metritis y quistes ováricos durante el post parto temprano (Underwood, 1983).

El selenio también muestra una gran influencia en la fertilidad del macho afectando a la calidad del semen, se encontró que el plasma seminal contiene elevadas

cantidades de GSH-Px, cuya función es proteger a la membrana del espermatozoide del ataque peroxidativo; además, en la cola del gameto masculino hay un selenopéptido que hace que ante una deficiencia de selenio se produzca una fractura en mitad de la cola del espermatozoide (Radostits y col., 2002).

En numerosas especies estudiadas la deficiencia de selenio aparece asociada a una reducción de la función inmune. En vacas deficitarias en este oligoelemento se ha descrito una reducción de la actividad GSH-Px en las células fagocitarias y también una disminución de la capacidad bactericida de los neutrófilos frente a distintos agentes etiológicos como *Candida albicans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se ha demostrado además que tanto la respuesta inmune celular como la humoral están incrementadas en animales que reciben suplementos de selenio (Radostits y col., 2002).

En la actualidad no está totalmente establecido el papel de este oligoelemento en la respuesta inmune, si bien hay evidencias de que, al menos en parte, responde a la acción protectora ejercida por la GSH-Px. La actividad GSH-Px se incrementa en animales con valores de selenio adecuados, sin llegar a ser deficientes, en respuesta a procesos infecciosos, mientras que en aquellos que presentan valores deficientes de este oligoelemento, tras la inoculación con rinotraqueítis infecciosa bovina o parainfluenza tipo 3, no ocurre este incremento de actividad antioxidativa GSH-Px. La consecuencia más importante de la reducción de actividad inmune, en animales con bajos niveles de selenio, la constituye el aumento en la incidencia de patologías mamarias. Ello no debe sorprendernos si tenemos en cuenta que durante el período de lactación y sobre todo en la fase inicial de la misma, las células de la glándula mamaria están sometidas a una intensa actividad metabólica. Aunque no se conoce con exactitud el papel de este oligoelemento en la ubre, la menor actividad de la GSH-Px representa posiblemente el factor etiológico más importante en este tipo de procesos, fruto de la influencia de esta enzima sobre la actividad de los leucocitos polimorfonucleares, considerados de primera importancia en la fagocitosis y muerte intracelular de los patógenos mamarios. La suplementación con selenio/vitamina E parece a su vez optimizar la resistencia que presenta el animal provocando un aumento de la función de los macrófagos (Manual Merck, 2000).

En un estudio realizado en Escocia sobre la relación del status de Se con la resistencia a infecciones bacterianas y virales en terneros, se observó que la mayor tasa de mortalidad (22%) se presentó en un establecimiento con valores promedio excesivamente bajos de 16U/g Hb. (Suttle y Jones, 1989).

La mayor parte de los diagnósticos de campo se establecen con base en hallazgos clinicopatológicos, en respuesta al tratamiento y procedimientos de control usando Selenio. El análisis de GSH-Px en sangre entera es uno de los procedimientos usados en el caso de la existencia de la distrofia muscular enzoótica, ayudado con el estudio de concentraciones de Se en el suelo, muestras de alimentos y tejidos animales. A su vez debido a la consecuencia del daño muscular producido en la distrofia muscular se liberan al torrente sanguíneo sustancias como mioglobina,

creatín fosfoquinasa (CPK), aspartato-amino transferasa (ASAT), lactato deshidrogenasa (LDH), de suma importancia en el diagnóstico de la enfermedad.

La actividad de la CPK en plasma es uno de los datos de laboratorio que se emplea en el diagnóstico de distrofia muscular en terneros, corderos y potros. La misma es específica del músculo estriado, cardíaco y esquelético y es liberada a la sangre luego del ejercicio intenso sin entrenamiento y en la miodegeneración. En el ganado bovino y ovino la vida media es de 2 a 4 hs y los niveles plasmáticos descienden con rapidez, a menos que haya miodegeneración continua, pero sigue siendo un buen indicio de la presentación previa al daño muscular durante un período de tres días. Los niveles plasmáticos de CPK (UI/lt) son: en ovinos 52 ± 10 , bovinos 26 ± 5 , equinos 58 ± 6 y cerdos 226 ± 43 . En bovinos y ovinos que sufren distrofia muscular aguda los niveles de CPK aumentan generalmente por sobre 1000 UI/litro y es común encontrar valores entre 5000 a 10000 UI/litro.

Generalmente, si el tratamiento fue el adecuado, los niveles de CPK retornan a la normalidad entre 5 a 7 días después. Por otra parte los niveles persistentemente altos sugieren que la degeneración muscular esta aun en progreso o que ha ocurrido durante los dos últimos días. (Radostits y col., 2002).

La actividad de ASAT también constituye un indicador de daño muscular, pero no es tan claro como el de CPK, debido a que el incremento de los niveles de ASAT también puede deberse a daño hepático.

La magnitud del aumento de ambas enzimas es directamente proporcional al daño muscular, ambas son elevadas en una fase inicial, pero un nivel elevado de ASAT y uno disminuido de CPK sugieren que la degeneración muscular ya no esta en actividad. Otro método útil par el diagnostico es el aumento marcado de la excreción de creatinina. En terneros la tasa de excreción normal en la orina es de 200 a 300 mg/ 24 horas.

El estado normal de selenio en bovinos esta representado por la concentración sanguínea global de este elemento de 100 ng/ml. Hay una relación lineal positiva ($r = 0.87-0.95$) entre la actividad de GSH-Px de sangre y la concentración sanguínea de Se en bovinos.

En comparación, los totales en sangre de GSH- Px son deficientes cuando son menores de 100U/g de Hb, marginales de 100–130 U/g Hb y adecuados por encima de 130 U/g Hb. Monitorear esta enzima es un buen indicador del nivel de ingreso de Se dietético y de la respuesta a la administración oral o parenteral de este elemento traza (Randox, 1990).

5. OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo fueron:

Generales

Determinar variaciones de la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre de bovinos.

Particulares

1. Poner a punto y validar una técnica para la determinación de GSH-Px en sangre bovina generada en el Laboratorio de Ruminantes de la Facultad de Veterinaria en comparación con técnica comercial.
2. Determinar la actividad de la enzima GSH-Px en bovinos a campo en otoño e invierno.
3. Valorar diferencias entre dos categorías etarias.
4. Valorar diferencias entre animales tratados y no tratados con selenio a nivel de campo.

6. HIPOTESIS

La actividad de glutatión peroxidasa en sangre bovina varía de acuerdo a épocas del año, a categorías etarias y por tratamientos con selenio.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 ENSAYO DE PUESTA A PUNTO Y VALIDACION

Durante el año 2007 la puesta a punto de la técnica de determinación de la actividad de la GSH-Px se hizo en base a la repetibilidad del ensayo de 6 series de un total de 94 muestras, en distintas épocas del año, con sangre entera heparinizada al 2% extraída por venopunción yugular de animales clínicamente sanos de la Facultad de Veterinaria.

Se validó la técnica mediante: 1) la determinación analítica de la enzima pura a una concentración conocida, 2) con el agregado de una cantidad conocida a una muestra de ensayo y 3) comparándose con un análisis en paralelo de las mismas muestras con un kit comercial de determinación de GSH-Px en sangre bovina (Ransel®).

Se realizaron series repetidas hasta lograr un coeficiente de variación (desvío estándar/promedio x 100) de valor uniforme y de un rango menor al 5%.

De esta forma se obtiene una estimación del error experimental para establecer su precisión. A medida que el número de repeticiones aumenta, las estimaciones de las medias poblacionales, esto es, las medias observadas de los tratamientos, se hacen más precisas (Steel y Torrie, 1998).

En el primer ensayo se obtuvo sangre de un bovino hembra cruce de 10 años de edad. Con esta sangre se prepararon 4 tubos de hemolizado, realizando una serie de lectura para cada uno de ellos (n=4). En cada una de estas series se medía la diferencia de absorbancia en tiempo 0, 1 y 2 min. Esta metodología fue también empleada en los ensayos posteriores.

Finalmente se procedió a determinar los valores de hematocrito (%) y de hemoglobina (g/dl), necesarios para determinar la actividad de la enzima GSH-Px.

El segundo ensayo se realizó con un novillo Holando de 3 años de edad y con la sangre obtenida se prepararon 7 tubos de hemolizado, realizando para cada uno de ellos tres series de lecturas (n=21).

Debido a que en la preparación de los reactivos se trabaja con volúmenes muy pequeños, el porcentaje de error a consecuencia de la manipulación es muy alto. Es por ello que se realizaron tres series de lectura para cada tubo, obteniendo de esta manera un valor promedio final, descartando los valores erráticos.

Los tubos y los reactivos se colocaron a baño maría a 25° C. La lectura por espectrofotómetro a 340nm se realizó de la siguiente manera: cada uno de los tubos se mezclaron con los reactivos y por cada tubo se realizó tres series de lectura midiendo en cada caso tiempo 0, 1 y 2 con un intervalo de un minuto cada uno.

El tercer ensayo fue realizado con sangre del mismo animal procediendo de igual manera que el caso anterior (n=21).

En el cuarto ensayo se obtuvo sangre entera heparinizada de novillo, raza Holando, de 3 años de edad.

La sangre se dividió en 4 tubos, preparándose los hemolizados (200 ul de sangre en 4 ml de agua destilada) para su posterior análisis. Los tubos y los reactivos se colocaron a baño maría a 25° C. La lectura por espectrofotómetro a 340 nm se realizó de la siguiente manera: 2 de los tubos se mezclaron con los reactivos y por cada tubo se realizó tres series de lectura (n=6). Otros dos tubos se mezclaron de igual forma que los anteriores pero además se adicionó la enzima pura (GSH-Px) y se procedió a leerse de igual forma (n=6).

Además se prepararon dos tubos con la enzima GSH-Px pura con una concentración de 143 U/l en 5.773 µl y se adicionaron los reactivos realizando la lectura de igual forma que los tubos mencionados anteriormente (n=6).

Luego de obtenidas las lecturas se realizó el procesamiento de los resultados tomándose como referencia para los cálculos el kit Ransel®, por lo cual la diferencia en la lectura entre la muestra y el blanco fue multiplicada por el factor 8412 (Ransel®), obteniéndose así las unidades por litro de hemolizado (U/L hemolizado),

el cual posteriormente se multiplica por el factor de dilución, en este caso 41, para así obtener los resultados en unidades/litro de sangre entera.

En el quinto ensayo se empleo la técnica de Ransel®, obteniéndose sangre entera heparinizada del mismo bovino del mes anterior de raza Holando, de 3 años de edad. La sangre se dividió en tubos de igual forma que el ensayo anterior y colocándose las mismas a un baño de 25°C. La lectura por el espectrofotómetro a 340 nm se realizó de igual forma, cambiando únicamente los reactivos por los del Kit Ransel®.

En el sexto ensayo se obtuvo sangre entera heparinizada de bovino, raza Holando, de 3 años de edad.

Se prepararon dos tubos con el hemolizado, uno con la enzima pura en volumen de 5.773 µl y concentración de 143 U/l de hemolizado y dos con enzima + sangre.

Para cada uno se realizaron tres series de lecturas de valores (n= 6). Los tubos a igual que los ensayos anteriores fueron colocados a baño maría a 25°C y se procedió de misma forma con respecto a la lectura en espectrofotómetro.

7.2 PREPARACION DE REACTIVOS

Para la puesta a punto y validación de la técnica de laboratorio se prepararon los reactivos por los siguientes protocolos.

7.2.1 Protocolo 1

Los reactivos se prepararon de la siguiente manera, para el reactivo 1: se pesaron en una balanza electrónica, 10 mg de NADPH y 80 mg de GSH y luego se mezclaron en 48 ml de Buffer Fosfato y 40 µl de GSH reductasa.

El Buffer Fosfato se prepara con 70 ml de KH₂PO₄ 100 mM, 130 ml de NA₂HPO₄ 100mM y 0.2 grs de EDTA Na₂. El KH₂PO₄ se prepara con 6.805 g de KH PO y agua destilada hasta 500 ml, mientras que el NA₂HPO₄ se prepara con 7.1 g del mismo en agua destilada hasta 500 ml.

Para el caso del reactivo 2, se mezclaron 14 µl de cumeno en 20 ml de agua destilada. Los mismos fueron colocados en baño maría a 25° C.

Lo primero que realizamos fue el análisis del blanco, el cual consta de 5.773 µl de agua destilada + 222.02 µl de reactivo 1 y 22.2 µl de reactivo 2, luego de mezclar procedimos a la lectura de la disminución en la absorbancia durante 2 minutos a una longitud de onda de 340 nm y a una temperatura de 25° C. Posteriormente realizamos la lectura de las muestras, el cual se procedió de la siguiente manera: de cada tubo (hemolizado) con micro pipeta se extrajo 5.773 µl y se lo mezcló con 222.02 µl de reactivo 1 y 22.2 µl. de reactivo 2, pasando luego a la lectura del espectrofotómetro. Se recogen 3 valores: tiempo 0, tiempo 1 (1 min.) y tiempo 2 (2 min.). La composición de los reactivos y concentración final en el ensayo se describen en el cuadro I.

La actividad de GSH-Px en U/Litro de hemolizado se obtuvo de la ecuación:

$$U/L = (1663 \times \Delta Abs_{min. muestra}) - (1663 \times \Delta Abs_{min. blanco}).$$

Para calcular la actividad de GSH-Px de la muestra en U/g de hemoglobina (Hb) se emplea la ecuación: $U/g\ Hb = (U/L\ hemolizado \times 43.2)/hemoglobina\ (g/dl)$, siendo 43,2 el factor de dilución de la técnica.

La exactitud de la técnica se controló mediante el análisis de actividad de enzima pura bovina (enzima GSH-Px sigma) con un valor estandarizado de 146 U/L de hemolizado.

Cuadro I. Composición de los reactivos y concentración final en el ensayo para la determinación de la actividad sanguínea de la glutatión peroxidasa. Técnica de laboratorio.

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
Reactivo 1: Buffer sustrato:	
Glutatión reducida	2.45 M/l
Glutatión reductasa	0.2 mg/ml
NADPH	8.33 M/l
Buffer fosfato (pH 7)	
EDTA (sal tetrasódica)	100 mmol/l
	4.3 mmol/l
Reactivo 2 (Starter):	
t- butil hidroperóxido de cumeno	0.18 mmol/l

NADPH: nicotinamida; M/l: mol por litro; mg/ml: miligramo por mililitro, mmol/l: milimol por mililitro.

7.2. 2 Protocolo 2: Determinación de GSH-Px con kit comercial (Ransel®).

Método por lectura en rango ultravioleta (UV): este método es basado en el trabajo de Paglia y Valentine (1967). Se mide la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro y se obtienen los valores de actividad de GSH-Px en unidades por litro de hemolizado mediante el cálculo= $(8412 \times \Delta Abs/min\ muestra) - (8412 \times \Delta Abs/min\ blanco)$. El valor 8412 es el coeficiente de extinción de la GSH-Px.

Para calcular la actividad de GSH-Px de la muestra en unidades por gramo (U/g) de hemoglobina (Hb) se emplea la ecuación: $U/g\ Hb = (U/L\ hemolizado \times 41)/hemoglobina\ (g/dl)$. El valor 41 corresponde con la dilución de la muestra.

La composición de los reactivos y concentración final del ensayo se describen en el Cuadro II.

Cuadro II. Composición de los reactivos y concentración final para el quinto ensayo, para la determinación de la actividad sanguínea de la glutatión peroxidasa con kit Ransel®.

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
Reactivo Nº 1:	
Glutatión reducida	4 mmol/l
Glutatión reductasa	≥ 0.5 U/L
NADPH	0.34 mmol/l
Buffer fosfato (pH 7.2)	0.05 M/l
EDTA (sal tetrasódica)	4.3 mmol/l
Reactivo 2 (Starter):	
t- butil hidroperóxido de cumeno	0.18 mmol/l

NADPH: nicotinamida; M/l: mol por litro; mg/ml: miligramo por mililitro, mmol/l: milimol por mililitro; U/L: unidades por litro

7.2.3 Determinación de la hemoglobina y el hematocrito.

Las muestras fueron procesadas dentro las 24 horas de su obtención, lo primero que se determinó fue la concentración de hemoglobina y de hematocrito para relacionarlos con los resultados de la GSH-Px.

El hematocrito se midió mediante el método de microhematocrito y la hemoglobina por el método UV (HemogloWiener®). Este método se basa en la oxidación de la hemoglobina en presencia de ferricianuro a meta hemoglobina que a su vez se combina con iones cianuro a pH 7.2, convirtiéndose en cianuro de hemoglobina. Para su lectura se utilizó una longitud de onda de 540 nm.

Para llevar a cabo los métodos descritos anteriormente se empleó un espectrofotómetro AGILENT modelo 8453, con detector compuesto por un arreglo de diodos.

7.3 PRINCIPIOS DE LA TECNICA ANALITICA (Técnica Laboratorio y Kit Ransel®).

La actividad sanguínea de GSH-Px se analizó mediante un reactivo comercial basado en una técnica cinética compuesta NADPH- dependiente (Paglia y Valentine, 1967). La técnica está basada en la determinación de la oxidación del glutatión reducido (GSH) por el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en una reacción catalizada por la GSH-Px que contiene el hemolizado (Reacción 1). El GSH se mantiene a una concentración constante durante la reacción mediante la adición de glutatión reductasa y fosfato de nicotinamida adenindinucleótido (NADPH), así, el glutatión oxidado (GSSG) se reduce formando GSH y el NADPH es oxidado y consumido durante la reacción (Reacción 2).



La tasa de formación de GSH es monitoreada mediante la disminución en la absorbancia a 340 nm producida por el consumo del NADPH a 25° C. La diferencia en el consumo de NADPH entre el blanco y la muestra determina la actividad enzimática de GSH- Px, siendo esta directamente proporcional a la disminución en la absorbancia en función del tiempo.

7.4 TRABAJO EXPERIMENTAL

El ensayo se realizó en el establecimiento "La Serena ", el cual se encuentra ubicado en el departamento de Treinta y tres, en el Km 317.5 de la ruta 18, perteneciente al paraje El Oro, de la firma Nuevo Manantial S.A.

Su superficie es de un total de 5400 has de campo natural, de las cuales 1000 has se encuentran con mejoramiento (*Lotus macu*), el tipo de producción es la ganadería y la forestación, con un sistema de explotación de ciclo completo.

La raza empleada es básicamente el Hereford, los animales reciben sales minerales prácticamente todo el año ya sea en forma de bloques minerales o en forma inyectable.

El porcentaje de preñez se encuentra en un 90%, con una parición del 80 %, los animales en el momento del entore pasan a pasturas mejoradas y luego al momento del parto.

Se seleccionaron 2 grupos de animales para el ensayo del otoño, formado por 24 vaquillonas de 1 a 2 años y 10 vacas, siendo este último grupo de animales tratado previamente con 15 mg de Se en forma subcutánea. Para la segunda prueba realizada en el invierno se tomaron otros 2 grupos de animales, uno de 15 novillos 1 a 2 años y el otro de 15 vacas, siendo este último grupo tratado previamente con selenio de igual forma que el otoño.

7.4.1 MUESTREO

La primera extracción de sangre se realizó en marzo del 2008, se tomaron 10 ml de sangre por animal, obtenidas por venopunción yugular, recolectadas en tubos heparinizados al 2% (Hussein, 1981). Las muestras se las mantuvo refrigeradas con conservantes hasta su llegada al Laboratorio de Patología y Clínica de Rumiantes y Suinos de la Facultad de Veterinaria.

El segundo muestreo se realizó en junio del 2008, las muestras fueron transportadas de la misma forma que la anterior.

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La puesta a punto y la validación de la técnica se analizaron estadísticamente mediante el estudio de la media, desvió estándar y coeficiente de variación, comparándose por la prueba t de Student, de variables numéricas de distribución continua.

Los resultados obtenidos en los muestreo de campo se analizaron estadísticamente de igual forma y además se realizó un Test t de Student con un nivel de significación de $P < 0,05$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 PUESTA A PUNTO Y VALIDACION DE LA TECNICA

Para la puesta punto y validación de la técnica se obtuvieron los resultados (CUADRO III).

Cuadro III: Resultados de los ensayos realizados en animales de la Facultad de Veterinaria para validación de técnica.

ensayo	MUESTRA	HEMOGLOBINA g/dl	U/Lt de Hemollizado	U/g de Hb	Enzima pura U/L	Hemato crito (%)
1	bovino hembra 10 años	11.5	76.8	202.5		33
2	novillo 3 años	12.5	95.0	123.0		32
3	novillo 3 años	12.5	78.0	187.4		32
4	novillo 3 años	9.5	161.4	520.1	147.3	32
5	novillo 3 años	9.5	292.2	900.9	167.1	32
6	novillo 3 años	9.5	181.7	723.1	164.5	32

Unidades: Hemoglobina: g/ dl; Hemollizado: U/Lt de la actividad de GSH- Px ; U/g Hb; unidad por gramo de Hemoglobina ; U/L: unidad por litro de sangre entera.

8.1.1 Primer ensayo – técnica de laboratorio:

Los datos obtenidos promedio fueron:

202.5±56.8 U/g Hb, n= 4 muestras, con un coeficiente de variación de 28.1%.

2000.3 U/Lt de sangre entera±25.16. CV= 32.8 %

8.1.2 Segundo ensayo - técnica de laboratorio:

Los datos obtenidos fueron los siguientes:- los tubos sangre + reactivos, dieron 123±42 U/g Hb, n= 21 muestras, con un coeficiente de variación de 34 % y en U/Litro de sangre entera 95±23.5. CV= 24.7 %.

8.1.3 Tercer ensayo – técnica de laboratorio:

Los valores obtenidos fueron: 187.4±42.9 U/g Hb, n= 21 muestras, con un coeficiente de variación de 22.9 % y en U/Lt de sangre entera 78±12.4. CV= 15.8 %.

8.1.4 Cuarto ensayo -técnica de laboratorio:

Los resultados fueron los siguientes: las muestras 520.1±18.6 U/g Hb, n= 6 muestras, con un coeficiente de variación de 3.6%. Los resultados en U/Lt de sangre entera 161.4±4.10. CV= 2.5%.

Tubos enzima + reactivos, dieron 455.9 ± 23.1 U/g Hb, n= 6 muestras, con un coeficiente de variación de 5.1% y en U/Lt de sangre entera 147.3 ± 5.1 . CV= 3.4%

Tubos enzima + sangre + reactivos, dieron 1012 ± 21.5 U/g Hb, n= 6 muestras, con un coeficiente de variación de 2.1 % y en U/Lt de sangre entera 269.6 ± 4.7 . CV= 1.8 %.

El valor promedio de unidades/litro de hemolizado para la actividad de la enzima GSH-Px pura fue de 147.3. El valor conocido para la misma es de 143 U/L hemolizado.

8.1.5 Quinto ensayo - técnica Ransel®:

Los resultados obtenidos para esta prueba fueron:

Tubos sangre + reactivos: 900 ± 133.9 U/g Hb, n= 6 muestras, con un coeficiente de variación de 14.9 % y en U/Lt de sangre entera 292.3 ± 29.4 . CV= 10.1 %.

Tubos enzima + reactivos: 332 ± 130 U/g Hb, n= 6 muestras, con un coeficiente de variación de 39.2 % y en U/Lt de sangre entera 167.1 ± 28.6 . CV= 17.1 %.

Tubos enzima + sangre + reactivos, dieron 1573 ± 148.8 U/g Hb, n= 6 muestras, con un coeficiente de variación de 9.5 % y en U/Lt de sangre entera 440 ± 32.7 . CV= 7.4 %.

El valor promedio de unidades/litro de hemolizado para la actividad de la enzima GSH-Px pura fue de 167.1.

8.1.6 Sexto ensayo - técnica de laboratorio:

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tubos sangre + reactivos= 723 ± 6.4 U/g Hb, n= 6 muestras con coeficiente de variación 0.9 % y en U/Lt de sangre entera 182 ± 1.4 , CV= 0.7 %.

Tubos enzima + sangre + reactivos= 1313 ± 48.6 U/g Hb, n= 6 muestras con un coeficiente de variación de 3.7 % y en U/Litro de sangre entera 311.5 ± 10.7 , CV= 3.4 %.

El valor promedio de unidades/litro de hemolizado para la actividad de la enzima GSH-Px pura fue de 164.5.

En todos los ensayos realizados para la validación de la técnica se observa una disminución en los valores correspondientes al coeficiente de variación (CV%)

para la actividad sanguínea de GSH-Px, lo que demuestra una mayor exactitud en la manipulación y en los resultados obtenidos posteriormente.

Además se obtuvieron valores aproximados al valor de la enzima GSH-Px bovina pura llegando a obtener la exactitud deseada para la técnica.

8.2 MUESTREO EXPERIMENTAL

8.2.1 1^{er} Muestreo: Establecimiento la serena, Treinta y Tres (13/03/08):

El promedio y el desvío estándar para la actividad sanguínea de GSH- Px de las vacas fue 256 ± 97 U/g Hb, encontrándose que el 80% de los animales presentaban valores normales (>130 U/Hb), un 10% con valores bajos de Se (≤ 100 U/g Hb) y un 10% marginal ($100 - 130$ U/Hb). (Randox, 1990).

Con respecto a las vaquillonas el promedio y desvío estándar de la actividad sanguínea de GSH- Px fue de 177 ± 116 U/g Hb, encontrándose el 59 % de los animales dentro de los valores normales de Se, un 22 % con valores bajos y 19 % marginales.

El promedio general de todos los animales fue 202 ± 111 U/Hb, estando un 65% con los valores normales, 19% bajo y 16% marginal.

De todos estos resultados se constata que existen diferencias estadísticamente significativas (test t, $p=0.0335$) entre los valores de GSH-Px de los grupos vacas y vaquillonas, siendo estos últimos notoriamente inferiores. Los resultados obtenidos se detallan en los cuadros IV y V.

Cuadro IV: Grupo vacas – 13/03/08

n° caravana	Hto	Hb	U GSH-Px/g Hb
100	27,0	6,0	113,2
71	36,0	11,8	275,1
132	34,0	9,2	311,5
54	33,0	9,4	311,8
24	33,0	11,2	77,2
103	36,0	9,8	354,5
3705	32,0	10,3	376,6
34	33,0	10,8	240,9
81	34,0	11,8	226,7
224	35,0	12,3	275,5
Promedio	33,3	10,3	256,3
Desvío estándar	2,6	1,8	97,0
Coef. variación	7,8	17,9	37,8
n	10	10	10

N° caravana= numero individual de cada vaca; Hto= hematocrito (%). Hb= hemoglobina (g/dl); U GSH-Px/g Hb= Unidades de Glutación peroxidasa por gramo de hemoglobina, Coef. variación= coeficiente de variación %, n= número de casos

Cuadro V: Grupo vaquillonas – 13/03/08

n° caravana	Hto	Hb	U GSH-Px/g Hb
367-9895	32,0	9,6	56,8
3715	33,0	9,8	171,6
176-8519	35,0	12,5	81,7
270-8286	35,0	9,4	130,5
329-3601	33,5	9,5	264,0
270-8320	34,5	10,0	81,1
nm 2	32,0	11,3	114,9
177-937	30,0	8,5	96,8
367-9885	34,0	9,6	100,8
2776-166	34,0	9,2	415,0
nm	35,0	10,3	119,3
329-3674	35,0	11,0	385,9
270-8332	35,0	10,6	159,9
176-8474	30,0	10,0	183,2
367-9855	34,5	12,6	113,9
176-7393	36,5	11,2	247,5
177-948	32,0	9,5	351,8
270-8282	31,0	9,9	189,2
177-968	36,0	12,0	209,2
176-7342	30,0	9,5	140,2
177-856	32,5	11,5	415,8
176-9701	34,0	11,3	113,6
329-3689	37,0	10,4	77,0
329-3645	39,0	12,1	98,2
Promedio	33,8	10,5	179,9
Desvío estándar	2,3	1,1	110,7
Coef. variación	6,8	10,8	61,5
n	24	24	24

N° caravana= numero individual de cada vaca; Hto = hematocrito (%). Hb = hemoglobina (g/dl); U GSH-Px/g Hb= Unidades de Glutación peroxidasa por gramo de hemoglobina, Coef. Variación= coeficiente de variación %, n= número de casos

8.2.2 2° Muestreo: Establecimiento la serena, Treinta y Tres (25/06/08).

El promedio y desvío estándar para la actividad sanguínea de GSH-Px de las vacas fue de 261 ± 146 U/g Hb, encontrándose que el 80% de los animales tenían valores normales, 13% bajo y 7 % con un valor marginal de Se.

En los novillos se observó un promedio y desvío estándar de actividad sanguínea de GSH-Px de 172 ± 143 U/g de Hb. El 46% estaban dentro de los valores normales, 27% bajo y un 27% marginal.

El promedio general de todos los animales fue de 216 ± 149 U/g de Hb, estando el 63% dentro de los valores normales, un 20% de valores bajos y 17% marginal. También se manifiestan diferencias notorias entre el grupo de las vacas y los novillos, encontrándose en estos últimos más del 50% de los animales con valores marginales a bajos. Los resultados se detallan en los cuadros VI y VII.

Cuadro VI: Grupo novillos – 25/06/08

n° caravana	Hto	Hb	UGSH-Px/g Hb
7524	31,0	9,5	105,5
7499	32,0	9,6	86,0
7461	32,0	9,5	98,2
7286	33,0	10,0	114,9
7512	33,0	11,0	654,3
7451	34,0	12,2	207,9
7508	33,5	9,5	191,9
7289	38,0	13,1	169,8
7553	36,0	11,0	201,5
7532	34,0	10,0	62,6
7551	34,0	12,2	71,2
7531	32,0	9,8	155,6
7488	33,0	12,2	210,0
7517	30,0	9,5	130,5
7498	32,0	9,5	113,7
Promedio	33,2	10,6	171,6
Desvío estándar	2,0	1,3	142,6
Coef. variación	5,9	12,0	83,1
n	15	15	15

N° caravana= numero individual de cada vaca; Hto= hematocrito (%). Hb= hemoglobina (g/dl); U GSH-Px/g Hb= Unidades de Glutación peroxidasa por gramo de hemoglobina, n= número de casos

Cuadro VII: Grupo vacas – 25/06/08

n° caravana	Hto	Hb	U GSH-Px/g Hb
230	27,0	6,0	96,48
1	36,0	11,8	68,09
2	34,0	9,2	201,44
3	33,0	9,4	406,72
4	33,0	11,2	151,59
5	36,0	9,8	629,04
71	32,0	10,3	187,06
54	33,0	10,8	269,20
81	34,0	11,8	337,18
103	35,0	12,3	110,63
199	36,0	9,8	383,95
16	32,0	10,3	205,93
127	33,0	10,8	218,00
261	34,0	11,8	318,14
22	35,0	12,3	342,09
Promedio	33,5	10,5	261,7
Desvío estándar	2,3	1,6	146,5
Coef. variación	6,8	15,4	56,0
n	15	15	15

N° caravana= numero individual de cada vaca; Hto= hematocrito (%). Hb= hemoglobina (g/dl); U GSH-Px/g Hb= Unidades de Glutación peroxidasa por gramo de hemoglobina, n= número de casos

En los grupos de vacas analizados en los dos muestreos, no se observan diferencias significativas en los valores promedios de U GSH-Px/g Hb (G1 = 256.3 U/g Hb y G2 = 261.7 U/g Hb), en el desvío estándar en el grupo de vacas del segundo muestreo se observa una mayor variación (G1 = 97 y G2 =146.5). Se calcularon estadísticamente diferencias entre promedios de grupos de animales por medio del test t de Student y se constataron algunas diferencias entre categorías y grupos (Cuadro VIII).

Por ser un establecimiento productivo y no disponer de libertad para la elección de los animales, solo se repitieron cuatro vacas en los dos muestreos.

En el único animal que existe diferencia es en la vaca 103, en el muestreo de marzo tuvo un valor de 354.5 U/g Hb y en el de julio fue de 110.6 U/g Hb.

Cuadro VIII: Test t muestreo experimental de campo

categorias	Hto	Hb	U GSH-Px/g Hb
vaquillonas/novillos	n.s.	n.s.	n.s.
vacas G1/vacas G2	n.s.	n.s.	n.s.
vaquillonas/vacas G1	n.s.	n.s.	sign.
vaquillonas/vacas G2	n.s.	n.s.	sign.
novillos/vacas G1	n.s.	n.s.	sign.
novillos/vacas G2	n.s.	n.s.	sign.
vaq-nov/vacas G1-G2	n.s.	n.s.	sign.

Valores de P (probabilidad) de la comparación por prueba t de Student de los resultados de los análisis de sangre en: Hto= hematocrito; Hb= hemoglobina; U GSH-Px/g Hb= Unidades de Glutación peroxidasa por gramo de hemoglobina; G1= grupo 1; G2= grupo 2, sign.= significativo estadísticamente $p < 0.05$, n.s.= no significativo $p > 0.05$

Con respecto a las categorías más jóvenes (vaquillonas y novillos) se observaron valores promedio similares entre si, 180 U GSH-Px/g Hb en las primeras y 172 U GSH-Px /g Hb en los últimos. Estos valores fueron más bajos que los de las vacas aunque su valor promedio se encuentra dentro de los rangos normales. El grupo de los novillos presentó un mayor desvío estándar 142,6 contra 110 de las vaquillonas.

9. DISCUSION

9.1 PUESTA A PUNTO Y VALIDACION DE LA TECNICA

Con los 6 ensayos realizados durante el año 2007 se logró primero llegar a una repetibilidad en la técnica, reduciendo el desvío Standard entre los valores obtenidos para una misma muestra. Al usar animales de la Facultad de Veterinaria clínicamente sanos, llegamos primero a discriminar si la técnica era confiable para detectar niveles deficientes o normales de actividad sanguínea enzimática.

En el primer ensayo el coeficiente de variación para las U/g de Hb de la sangre + reactivos fue de 28 % y para las U/Lt de sangre entera de 33 %.

A partir del tercer ensayo estos valores fueron disminuyendo, llegando en el último ensayo de diciembre de 2007 a valores de 4 %. De esta manera se llegó a obtener precisión en la técnica de laboratorio. Se ha señalado que una técnica es precisa cuando al analizar repetidamente una misma muestra, la variación entre los valores obtenidos es baja. Por lo general el coeficiente de variación o imprecisión de la técnica no debe ser superior al 10 %.

Se observa una diferencia notoria entre los valores obtenidos para la actividad de GSH-Px según la época del año, siendo los más bajos aunque todavía normales los obtenidos en los primeros ensayos que fueron realizados como se explicó anteriormente en otoño y principios de invierno. Esto coincide con lo citado previamente en la bibliografía en donde se destaca que la prevalencia de la DMN es mayor hacia fines del invierno en donde los animales pasan períodos largos con una alimentación deficiente en selenio (Radostits, 2002).

En los últimos ensayos se empleó enzima GSH-Px bovina pura (SIGMA®) como testigo, de esta manera se pudo determinar la precisión de la técnica al trabajar con valores conocidos de enzima.

En el primero de estos ensayos realizado el 11/10/07 luego de obtenidas las lecturas se procedió al procesamiento de los datos comparando las cuentas por la técnica de laboratorio con las del kit comercial Ransel® (Randox,1990). Además al emplear la enzima bovina pura como testigo se determinó que los datos obtenidos por la técnica de laboratorio eran aproximados al valor conocido para la misma. El promedio de unidades/litro de hemolizado para la actividad de la enzima GSH-Px pura según la técnica de laboratorio fue de 147,3 mientras que el valor conocido para la misma es de 143 U/L hemolizado.

El 1/11/07 se realizó otro ensayo esta vez con los reactivos del kit Ransel® usando como testigo nuevamente la enzima GSH-Px. En esta oportunidad el valor promedio para la enzima fue de 167,1 U/L de hemolizado, demostrando que los valores de la enzima pura eran similares tanto para la técnica de laboratorio como para el kit Ransel®.

En el último ensayo correspondiente a la validación, se comprobó que los valores para la enzima testigo seguían comportándose de forma similar con un valor promedio de 164,5 U/L de hemolizado.

De los resultados obtenidos por la técnica de laboratorio se observa un coeficiente de variación bajo (7,8 %) con respecto al valor conocido para la enzima. Por lo tanto es posible señalar que el método analítico empleado es exacto ya que la exactitud de una técnica esta dada cuando se obtienen resultados cercanos a un Standard conocido, en este caso la enzima GSH Px bovina pura.

9.2. MUESTREO EXPERIMENTAL

Los resultados observados en los 2 muestreos experimentales de campo marcan una diferencia significativa (test t, $p=0.0057$) entre las categorías jóvenes y adultos, presentándose los valores más bajos de actividad de GSH-Px (174 U/g Hb promedio) en las categorías más jóvenes (vaquillonas y novillos) a diferencia de las vacas (258.5 U/g Hb promedio).

Este último grupo presentaba además un tratamiento previo con minerales incluido Se, que podría estar relacionado a los mayores valores de la actividad sanguínea de la GSH-Px.

Dentro de las categoría más jóvenes (vaquillonas y novillos) no se observaron diferencias significativas (test t, $p=0.4193$) en la actividad de la enzima GSH-Px en los 2 muestreos experimentales de campo.

En los muestreos realizados en los grupos de las vacas no se evidenciaron diferencias significativas (test t, $p=0.4597$) en cuanto a los valores promedio de U GSH-Px/g Hb de los dos grupos analizados (256,3 U/g Hb en el primero y 261,7 U/g Hb en el segundo muestreo). Se observó un mayor desvío estándar en el segundo muestreo (146.5 contra 97 del primero) que puede ser debido a que este grupo se compone de 5 animales más. En el estudio realizado por Ceballos, (1998), se obtuvieron valores promedio en vacas de 161 ± 82 U GSH-Px/g Hb, encontrándose también la mayoría de los animales adultos dentro de los rangos normales. En los animales que se repiten en el grupo de las vacas se observa una variación notoria como se describió anteriormente en la vaca 103, la cual presentó en el segundo muestreo un valor marginal que puede deberse a un error experimental ya que los otros 3 animales repetidos se mantuvieron dentro de los rangos normales.

En el trabajo de Podestá, (1976) se determinó que la presentación de la enfermedad se daba desde fines del otoño hasta fines de la primavera, presentándose en terneros de ambos sexos a partir del destete. Cabe recordar que como se destacó en la sección de resultados, en las categorías más jóvenes se observó que un 47.5 % de los animales se encontraba dentro de los valores marginales a bajos, aunque ninguno de estos animales presentaban síntomas clínicos al momento de la extracción de sangre.

Como en otras partes del mundo, caso Nueva Zelanda, también se han dado enfermedades con respuesta al selenio, caso del desmedro de los corderos y terneros en pastoreo, de todas las edades y particularmente en el otoño e invierno. (Radostits, 2002).

En un trabajo realizado por Ceballos (1998), observaron en las vaquillonas, una disminución en la actividad enzimática cuando los animales retornaban a pastoreo, después de la época invernal, ésta baja sería una consecuencia del aporte deficitario de Se durante la estabulación invernal.

Weiss (1990) manifiestan que la actividad sanguínea de GSH-Px disminuye, si no hay una suplementación de Se adecuada después del destete ya que los animales dependen únicamente después de este periodo, del forraje y otros suplementos nutricionales para satisfacer sus requerimientos de minerales.

En el grupo de vaquillonas y novillos se registraron valores promedios similares para la actividad enzimática, 179.9 U/g Hb para las primeras y 171.6 U/g Hb en los novillos.

Estos animales se encontraban entre 1 a 2 años de edad y aproximadamente el 50 % presento valores de marginales a bajos. Estos valores son coincidentes con los obtenidos por Ceballos (1998), que en el otoño registraron valores promedio y desvío estándar de la actividad sanguínea de GSH-Px de 145 ± 90 U/g Hb, resaltando que las terneras lactantes presentaron la mayor actividad enzimática 209 ± 96 U/g Hb, mientras que las terneras de recría obtuvieron resultados de 119 ± 78 U/g Hb y vaquillonas

tuvieron una actividad menor de 99 ± 42 U/g Hb, por lo que podemos destacar que los animales en crecimiento como las terneras de recría y las vaquillonas son las categorías más afectadas ya que dependen del consumo de forrajes para satisfacer no solo su requerimiento de minerales sino de otros nutrientes.

También podemos destacar que en un trabajo realizado por Oblitas (2000) la actividad enzimática de GSH-Px en vaquillonas de 12–14 meses y de 18–20 meses fueron inferiores a los considerados adecuados (<130 U/g Hb), obteniendo en las primeras 34 U/g Hb promedio (deficientes) y las segundas 116 U/g Hb promedio (marginales). Estos valores indican que había desbalances metabólicos de Se y la deficiencia del mismo sería causada por un bajo contenido del mineral en la pradera, puesto que los animales solo consumían pasto. Al respecto se señaló que un 60 % de las praderas de la zona presentaban concentraciones del elemento <0.1 ppm (Wittwer, 1997), valor considerado como mínimo en la dieta para los bovinos (NRC, 1989).

10. CONCLUSIONES

- 1. Se puso a punto y se validó una técnica de laboratorio para la determinación de la actividad sanguínea de la GSH-Px en bovinos.**
- 2. Con la época del año no se encontraron diferencias significativas intra categorías etarias o intra tratamientos.**
- 3. Se comprobaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad sanguínea de GSH-Px entre las categorías de bovinos jóvenes (novillos y vaquillonas) y adultos (vacas) mantenidos a pastoreo, encontrándose en los primeros los valores más bajos de GSH-Px.**
- 4. Se comprobaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales tratados previamente con Selenio y los no tratados, los valores fueron más bajos en los no tratados.**

11. BIBLIOGRAFIA

1. Aiello, S.; Mays, A. Manual Merck de Veterinaria (2000). 5° ed. Barcelona, Océano, 2558p.
2. Board, P.; Peter, D. (1976). A simple test for glutathione peroxidase and selenium deficiency. Vet Rec 99:144-145.
3. Bompert, G. (1990). Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: Application to Cisplatin – induced toxicity. Clin Biochem, 23:501-504.
4. Ceballos, A. (2003). Blood activity of glutathione peroxidase as an indicator of the nutritional metabolic balance of selenium in dairy herds of Manizales, Colombia. Rev Colombiana Cienc Pec 16:19-25.
5. Ceballos, A.; Wittwer, F.; Contreras P.; Quiroz, E.; Böhmwald, H. (1999). Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. Pesq Agrop Bras, 12:2331-2338.
6. Ceballos, A.; Wittwer, F.; Contreras, P.; Böhmwald, H. (1998). Actividad sanguínea de la glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo, variación según edad y época del año. Arch Med Vet, 30:13-22.
7. Combs, G.; Combs, S. (1986). Chemical aspects of selenium. En: Combs, G.; Combs, S. The role of selenium in nutrition. Orlando. Academic press, pp. 1-14.
8. Daniels, J.; Hatfield, P.; Burgess, D.; Kott, R.; Bowman, G. (2000). Evaluation of ewe and lamb immune response when ewes were supplemented with vitamin E. J Anim Sci 78:2731-2736.
9. Eliseche, E. (2005). Selenio - Porqué es necesario considerar este micronutriente?. Buenos Aires, Laboratorios AGROINSUMOS, 11p.
10. Foster, L.; Sumar, S. (1995). Methods of analysis used for the determination of selenium in milk and infant formulae: a review. Food Chem, 53:453-466.
11. Gunzler, A. (1974). An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood. Z Klin Chem Klin Biochem 12: 444-448.
12. Han, B. (2000). Study on the free radical-induced damage in cattle with endemic fluorosis and the protective mechanism of selenium, copper and magnesium. Sci Agric Sinica 33 (6): 80-87.

13. Hussein, K.; Jones B. (1981). Effects of different anticoagulants on determination of erythrocyte glutathione peroxidase. *Acta Vet Scand* 22: 472-479.
14. Little, C.; Olinescu, R.; Reid, K.; O'Brien, P. (1970). Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 213, 14:3632-3636.
15. Mc Donald, P.; Edwards, R.; Greenhalgh, J (1993). *Nutrición animal* 5° ed. Zaragoza, Acribia, 576p.
16. National Research Council (1989). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 6° ed. Washington D.C. National Academy Press. 157p.
17. Oblitas, F.; Contreras, P.; Böhmwald, H.; Wittwer, F. (2000). Efecto de la suplementación con selenio sobre la actividad sanguínea de la glutatión peroxidasa y ganancia de peso en bovinos selenio deficientes mantenidos a pastoreo. *Arch Med Vet* 32: 27-35.
18. Ortuño, J. (1996). Biodisponibilidad del selenio y métodos de evaluación. *Food Sci Tech Int* 2:135-150.
19. Paglia, D.; Valentine, W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169.
20. Peter, D. (1980). Modified fluorescent spot test for glutathione peroxidase and selenium concentration in sheep blood. *Vet Rec*, 107: 193-196.
21. Podestá, M.; Colucci, P.; Armentano, J.; Da Fonseca, D.; Ohanian, C. (1976). Distrofia muscular nutricional. Primera comprobación en bovinos del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 13:19-35.
22. Radosits, O.; Gay, C.; Blood, D.; Hinchcliff, K. (2002). *Medicina Veterinaria*. 9° ed. México DF, Mc. Graw-Hill Interamericana, 2 v, 2215p.
23. Randox (1990). Ransel®: Glutathione Peroxidase. Technical brief. Crumlin, U.K. Randox Laboratories Ltd, 42p.
24. Reyilly, C. (1993). Selenium in health and disease: a review. *Aust J Nutr Diet*, 50:137-144.
25. Rotruck, J.; Pope, A.; Ganther, H.; Hafeman, D.; Swanson, A.; Hoekstra, W. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179:588-590.
26. Schwartz, K.; Foltz C. (1957). Selenium as an integral part of 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Am Chem Soc* 79: 3292-3293.

27. Schwartz, K.; Foltz C. (1958). Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem* 233: 245-251.
28. Steel , R.; Torrie J. (1988). *Bioestadística, principios y procedimientos*. 2ª ed. México, Mc Graw Hill, 622p.
29. Sunde, R.; Hoekstra, W. (1980). Structure, synthesis and function of glutathione peroxidase. *Nutr Rev* 38:265-273.
30. Suttle, N.; Jones, D. (1989). Recent developments in trace element metabolism and function: trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminants. *J Nutr* 119:1055-1061.
31. Thompson, K.; Fraser, A.; Harrop, P.; Kirk, J.; Bullians, J.; Cordes, D. (1981). Glutathione peroxidase activity and selenium concentration in bovine blood and liver as indicators of dietary selenium intake. *New Zealand Vet J* 29:3-4.
32. Underwood, E. (1983). *Los minerales en la nutrición del ganado* 2º ed., Zaragoza. Acribia, 210p.
33. Weiss, W. (1990). Effects of duration of supplementation of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 73:3187-3194.
34. Wichtel, J.; Craigie, L.; Varela Alvarez, J.; Williamson, N. (1994). The effect of intraruminal selenium pellets on growth rate, lactation and reproductive efficiency in dairy cattle. *New Zealand Vet J* 42:205-210.
35. Wiener Lab. (2000) HemogloWiener reactivo. Método colorimétrico para la determinación de hemoglobina como cianuro de hemoglobina en sangre. Rosario, Wiener lab, 28p.
36. Wittwer, F.; Aranela, P.; Ceballos, A. (2002). Actividad de glutatión peroxidasa en sangre de bovinos a pastoreo de la IX Región, Chile y su relación con la concentración de selenio en el forraje. *Arch Med Vet* 34:49-57.