



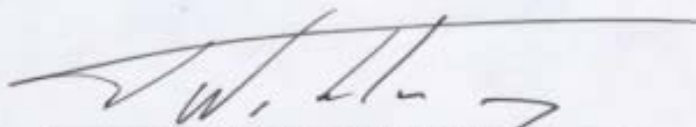
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias

Efecto de una dieta deficiente en Selenio sobre la capacidad antioxidante
y la magnitud del daño producido por el estrés oxidativo
en vacas Frisón negro

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Grado de LICENCIADO EN
MEDICINA VETERINARIA.

Eduardo Alfonso Street Billeke
Valdivia Chile 2000

PROFESOR PATROCINANTE



DR. FERNANDO WITWER M.

PROFESOR COPATROCINANTE



DR. PEDRO CONTRERAS B.

PROFESOR COLABORADOR

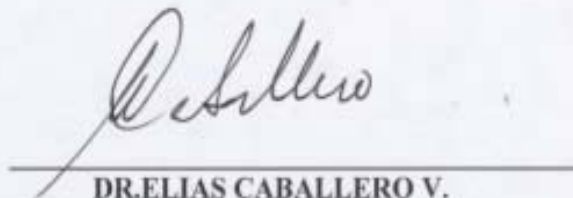


DR. ALEJANDRO CEBALLOS M.

PROFESORES CALIFICADORES



DR. OSCAR ARAYA V.



DRELIAS CABALLERO V.

FECHA DE APROBACION: 2 de Noviembre de 2000

INDICE GENERAL.

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODOS	9
5. RESULTADOS	12
6. DISCUSION	18
7. BIBLIOGRAFIA	21
8. ANEXOS	26
AGRADECIMIENTOS	30

**A mis padres,
Carolina y
hermanos,
MUCHAS GRACIAS**

1. RESUMEN

El selenio (Se) es un nutriente esencial para la vida animal, actuando como antioxidante a través de la seleno-enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px, EC 1.11.1.9), la cual reduce los radicales libres. El uso de una dieta deficiente en Se disminuye la capacidad antioxidante exponiendo las células al daño oxidativo, favoreciendo así el estrés oxidativo, entre cuyos efectos se describe la alteración de la estructura de los lípidos. Los objetivos de este trabajo son determinar el efecto de una dieta deficiente en Se sobre la capacidad antioxidante y el daño producido por el estrés oxidativo, determinando la actividad sanguínea de GSH-Px, el estado antioxidante total (EAT), la concentración de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) y el porcentaje de fragilidad osmótica de eritrocitos (FOE).

Se utilizaron 12 vacas Frisón Negro, clínicamente sanas, mantenidas confinadas con sujeción individual desde los 45-30 días preparto hasta los seis meses de lactancia, estas fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos homogéneos de seis vacas. Al azar las vacas de un grupo (Se-S) recibieron una suplementación con BaSe \dot{U} 4 (Se = 1 mg/kg s.c.) de liberación lenta (Deposel[®]). El otro grupo no fue suplementado (Se-D). La alimentación fue individual con una ración Se-deficiente (preparto Se = 0,03 ppm; lactancia Se = 0,048 ppm). De cada vaca se extrajo muestras de sangre cada quince días para determinar la actividad sanguínea de GSH-Px, concentración del EAT, concentración de TBARs y el % de FOE a una concentración de 0,55% de NaCl, cuyos resultados se analizaron utilizando ANDEVA de una vía y el test de "t".

La utilización de la dieta Se-deficiente provocó una disminución de la actividad de GSH-Px desde 118 ± 11 U/g Hb hasta 53 ± 11 U/g Hb a los 5 meses de iniciado el experimento, siendo este valor considerado deficiente (<60 U/g Hb). Los valores observados para el EAT fructuaron entre $0,96 \pm 0,05$ mmol/l a $1,29 \pm 0,08$ mmol/l, no evidenciando un efecto de la ración sobre este parámetro. Para la concentración de TBARs se obtuvo un valor inicial en el grupo Se-D de 250 ± 33 ng/ml, el cual aumentó a los 30 días postparto llegando a 393 ± 20 ng/ml, para luego disminuir lentamente. Una situación semejante se apreció en el grupo Se-S, siendo su disminución posterior más rápida. La fragilidad osmótica de los eritrocitos no se modificó con el consumo de la dieta, tanto en el grupo de vacas Se-D como en el Se-S, sin observarse tampoco diferencia entre ellos.

Se concluye que el uso en bovinos lecheros de una dieta Se-deficiente, como la empleada en la experiencia, provoca una disminución de la actividad de GSH-Px, la que puede ser corregida con una suplementación en el preparto con BaSeO₄. El uso de la dieta deficiente en Se no provoca un cambio apreciable en el EAT, en la lipoperoxidación y en la FOE. Además, se observa un aumento de los TBARs a los 30 y 45 días postparto señalando un mayor daño oxidativo, cuya recuperación sería más lenta en los animales Se-deficientes.

Palabras claves: Bovinos, Estrés oxidativo, Radicales libres, Selenio.

2. SUMMARY

Selenium (Se) is an essential nutrient for the animal life, Se is a component of the enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px; EC 1.11.1.9) and in this role is involved in the breakdown of free radicals. The use of a selenium-deficient diet, reduces the antioxidant capacity and exposes the cell to the oxidative damage and therefore favours the oxidative stress. The objective of this investigation is to determine the effect of selenium-deficient diet over the antioxidant capacity and the damage generated by the oxidative stress, determine the activity of GSH-Px, the total antioxidant status (EAT), concentration of thiobarbituric acid test (TBARs) and the erythrocyte osmotic fragility (FOE).

Twelve Black Frison cows, clinically healthy, maintained from 30-45 days prepartum until 6 months postpartum, six cows, chosen at random, were supplemented (Se-S) with BaSeO₄ (Se = 1 mg/kg s.c.), a commercial long acting product (Deposel®). The other group was not supplemented (Se-D). Each animal was given individually their Se-deficient diet (prepartum Se=0,03 ppm; postpartum Se=0,048 ppm). Coccigeal blood samples were obtained every two weeks from all the cows to measure GSH-Px blood activity, concentration of EAT, concentration of TBARs and the % of FOE at a concentration of 0,55 % of NaCl. A statistical analysis was performed by one way ANOVA and "t" test.

The use of selenium-deficient diet induced a decrease in the activity of GSH-Px from 118 ± 11 U/g Hb until 53 ± 11 U/g Hb, 5 months before initiating the experiment, this value is considered deficient (< 60 U/g Hb). The values observed for the EAT varied from $0,96 \pm 0,05$ mmol/l to $1,29 \pm 0,08$ mmol/l, showing no effect in the diet over this parameter. For the TBARs concentration, an initial value of 250 ± 33 ng/ml was obtained for the Se-D group, which increased 30 days postpartum to values of 393 ± 20 ng/ml, then slowly decreasing. A similar situation was seen in the Se-S group, being the later decrease much faster. The osmotic fragility of the erythrocytes was not modified with the diet, neither in the Se-D group nor in the SE-S cows, observing no difference between them.

As a conclusion, the use of a deficient diet in Se in dairy cows like the one used, produces a decrease in GSH-Px activity, which can be mitigated by supplementing with BaSeO₄ during the prepartum. The use of a deficient diet in Se does not produce a substantial change in EAT, in the lipoperoxidative process and in FOE. Futhermore, an increase in the TBARs was observed 30-45 days postpartum, showing greater oxidative damage whose recuperation would be slower in animals Se-deficient.

Key words: Bovines, Oxidative stress, Free radicals, Selenium.

3. INTRODUCCION

3.1 Radicales Libres

Radical libre (RL) es cualquier estructura química de existencia independiente que posee uno o más electrones impares girando alrededor del núcleo (Halliwell, 1987; Larkins, 1999; Cheeseman y Slater, 1993, Randox, 1994). Esta estructura electroquímica los hace ser muy inestables y altamente reactivos con otras moléculas no radicales (Halliwell, 1987).

A través de reacciones de óxido-reducción los RL interactúan con otras moléculas, con el objeto de lograr una configuración estable. Al reaccionar un RL con una molécula no radical, esta última se convierte en radical, desatándose una reacción en cadena. Esta reacción se detiene cuando dos radicales interactúan entre sí (Halliwell y Chirico, 1993; Randox, 1994).

Algunos autores han agrupado los RL presentes en los sistemas biológicos según el grupo funcional presente en su estructura (Kehrer, 1993; Halliwell y col., 1992; Halliwell, 1987). Dentro de las clasificaciones realizadas por los autores antes mencionados cabe destacar que el tipo más común e importante son los radicales con un centro de oxígeno (O_2) y de menor importancia serían los con un centro de sulfuro (Cheeseman y Slater, 1993; Kehrer, 1993; Halliwell y col., 1992).

Producto de la importancia del O_2 en los sistemas biológicos es que la mayoría de los RL presentes en los sistemas biológicos se forman a partir del metabolismo aerobio y otros procesos metabólicos que utilizan O_2 , por lo que los derivados de estas reacciones reciben el nombre de metabolitos oxigenados reactivos (MOR) (Miller y col., 1993; Barquinero, 1992), los cuales se producen en su mayoría en reacciones metabólicas normales, pudiendo verse incrementados por factores exógenos.

Las fuentes generadoras de estos MOR pueden ser de 2 orígenes según Halliwell y col. (1992) y Miller y col. (1993):

- a) Oxidantes de origen endógeno: dentro de estos tenemos los metabolitos generados durante la respiración aeróbica, el metabolismo de los neutrófilos y macrófagos, la degradación de los ácidos grasos y otras moléculas en los peroxisomas y la acción detoxificante del citocromo P-450.
- b) Oxidantes de origen exógeno: dentro de estos tenemos dietas con altas concentraciones de compuestos fenólicos, altas concentraciones de sales de cobre y de hierro en la dieta y el óxido de nitrógeno derivado del consumo de tabaco.

3.2 Estrés Oxidativo

El término estrés oxidativo describe un disturbio del balance prooxidante:antioxidante en favor de los primeros que puede provocar daño en las células (Lunec, 1996; Kehrer, 1993). Según Miller y col., (1993) el estrés oxidativo es el resultado de una deficiencia de sustancias protectoras (antioxidantes) o de una excesiva exposición a agentes prooxidantes (radicales libres); es decir, el estrés oxidativo se produce cuando las sustancias prooxidantes sobrepasan la capacidad antioxidante orgánica.

De acuerdo a las definiciones anteriores y lo expresado por Machlin y Bendich (1987), existe un balance crítico entre la generación de radicales libres y la defensa antioxidante.

Cualquier estructura orgánica puede ser atacada u oxidada por los radicales libres, generando un estrés oxidativo (Kehrer, 1993; Randox, 1994). No obstante, las más susceptibles son los lípidos (Cheeseman y Slater, 1993).

La lipoperoxidación (LPO) es un proceso muy destructivo, ya que actúa como una reacción en cadena autoperpetuante (Cheeseman y Slater, 1993). La LPO daña la estructura del lípido, siendo las consecuencias de este deterioro más evidentes cuando estos lípidos son constituyentes de membranas biológicas (Wang y col., 1996; Halliwell y col., 1987; Slater, 1984).

3.2.1 Alteraciones relacionadas con el Estrés Oxidativo

Los MOR en bajas concentraciones son beneficiosos e incluso indispensables; como por ejemplo, en la defensa contra microorganismos. Los MOR están presentes en todo el ciclo celular, desde el nacimiento a la muerte (Mates y col, 1999).

No obstante, se ha determinado que al existir un desbalance entre los prooxidantes y antioxidantes se presentan algunas afecciones que merman fuertemente el rendimiento y la producción del animal. En animales de producción se han observado alteraciones cuya etiología se relaciona con el estrés oxidativo, ya que a la suplementación con antioxidantes se reduce la incidencia de ellas (Miller y col., 1993).

Entre las enfermedades asociadas al estrés oxidativo tenemos: retención de placenta, edema de ubre, mastitis, fiebre de leche, alteraciones del sistema inmune por una reducción de la inmunocompetencia (Wang y col, 1996; Halliwell y col., 1987; Slater, 1984).

3.3 Evaluación de la Actividad de los Radicales Libres

Producto de la corta vida y alta reactividad, la actividad de los RL es evaluada principalmente por métodos indirectos, determinando los productos del daño tisular (Cheeseman y Slater, 1993; Lunec, 1996).

Un indicador de daño en las proteínas son los carbonilos proteicos y la 3-nitrotirosina. En el caso del ADN la acción de los RL se refleja por la formación de 8-hidrodesoxiguanosina y en el caso de los lípidos se usan como indicadores el malonaldehído (MDA), los gases hidrocarbonados y el F2-isoprostano (Rimbach y col, 1999; Lunec, 1996).

Según Halliwell (1987) la LPO es el último evento que acompaña a la lesión celular y no siempre es la causa del daño, en este sentido Morrissey y O'Brien (1998) indican que el mayor interés se ha centrado en la detección de productos de la LPO para evaluar el estrés oxidativo debido a la mayor facilidad con que estos productos pueden medirse.

Halliwell y Chirico (1993) indican que el test de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) es uno de los más usados, por su simplicidad y bajo costo, para evaluar la LPO. Este test es utilizado para medir MDA formado durante la LPO.

Otro parámetro utilizado para evaluar el daño causado por el estrés oxidativo es la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE). El daño oxidativo sobre los lípidos o la alteración proteica de la membrana celular de los eritrocitos, induce a el bloqueo de las bombas iónicas alterando el movimiento de iones y agua que finalmente llevan a la lisis celular (Edwards y Fuller, 1996).

3.4 Sistemas Antioxidantes

Como los RL se producen constantemente y en forma inevitable en los sistemas biológicos, las células han desarrollado poderosos y complejos sistemas de defensa para limitar la exposición a estos agentes (Morrissey y O'Brien, 1998; Miller y col., 1993).

Las sustancias que neutralizan el potencial efecto nocivo de los radicales libres se les denomina antioxidantes, siendo estos cualquier sustancia que retarde o inhiba el daño oxidativo a una molécula susceptible (Yu, 1994; Halliwell y col., 1992; Chaudiere y col., 1999; Harris, 1992).

Según Maxwell (1995) los antioxidantes de mayor importancia han sido clasificados en tres grupos: a) antioxidantes enzimáticos, b) antioxidantes no enzimáticos de origen endógeno y c) antioxidantes no enzimáticos de origen exógeno.

La evaluación del estado antioxidante total (EAT) busca establecer cuál es la capacidad del organismo para responder al estrés oxidativo. Esta determinación no discrimina entre las diferentes sustancias sino que considera la defensa antioxidante como un todo. El objetivo de evaluar el estado antioxidante total es identificar individuos en riesgo por desbalances prooxidantes:antioxidantes, identificar desbalances nutricionales de antioxidantes, determinar las medidas terapéuticas a usar y evaluar su respuesta (Randox, 1994).

3.5 Selenio como antioxidante

El selenio (Se) fue estudiado en el pasado por los efectos tóxicos que provocaba en los animales cuando este se encuentra en una concentración excesiva en el organismo, generando la enfermedad conocida como Selenosis (Church, 1995; Garner, 1970). Sólo a fines de la década del 50 se demostró que el Se prevenía la degeneración hepática en ratas y la diátesis exudativa en pollos (Patterson y col, 1957; Schwarz, 1957), comprobándose con esto su esencialidad para la vida.

Una función básica del Se es su actividad como antioxidante a través de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px, EC 1.11.1.9) (Rotruck y col, 1973), la cual tiene como misión destruir los peróxidos de hidrógeno, acción de gran importancia en la mantención de la integridad de las membranas celulares (Bondi, 1988; Ferreira, 1992).

3.5.1 Metabolismo del selenio

Existen ciertos factores que interfieren en el metabolismo del Se, entre los cuales podemos mencionar su forma química, interferencias con otros minerales, la concentración tisular preexistente y la cantidad y tipo de excipiente (Underwood, 1987; Ullrey, 1992; Henry y col, 1988).

3.5.1.1 Absorción, transporte y almacenamiento: La absorción del Se en los rumiantes se realiza mayoritariamente desde el yeyuno, donde el mecanismo de absorción es similar al de los monogástricos (Ammerman y Miller, 1975).

En poligástricos la absorción de Se es baja, en promedio un 35 %, ya que varía de acuerdo a la concentración de Se en la dieta. Los animales alimentados con una dieta deficiente en Se presentan una mayor absorción de este mineral respecto a los alimentados con una dieta con una concentración normal de Se. Además es importante la forma en la cual el Se es administrado al animal, ya que al ingerirse como aminoácidos que contienen Se, se produce una mayor concentración de este mineral, que si es ingerido como Selenito de Sodio (Georgievskii, 1981).

Luego de ser absorbido el Se es transportado al hígado unido a proteínas plasmáticas (albúmina); luego se produce la reentrada del Se al plasma, esta vez ligado a globulinas(α - y γ -globulinas) para ser distribuido en los diferentes pools de almacenamiento y compartimientos de liberación lenta, preferentemente tejidos con una composición proteica (Hidiroglou y Jenkins, 1973; Symonds y col., 1981).

La transformación metabólica del Se es la incorporación del mineral en los sitios del organismo donde ejerce su acción biológica, formando parte de la estructura del tejido o como componente de otros elementos tisulares (Burk, 1991; Gerloff, 1992).

3.5.1.2 Excreción: La excreción del Se se realiza mayoritariamente por las heces debido a la formación de sustancias inabsorbibles en el rumen. Otras vías de excreción de menor importancia son la urinaria, biliar, salival, láctea, pulmonar y el eructo además de lo que se transfiere al feto durante la gestación (Aspila, 1991; Amermman y Miller, 1975; Levander, 1986; Van Saun y col., 1989).

La cantidad de Se excretada en la leche es variable encontrándose valores entre 0,8 % a 11,1 % según la cantidad de Se administrada en la ración (Fisher y col, 1980; Conrad y Moxon, 1979).

3.5.2 Selenio y glutatión peroxidasa

El Se es un componente estructural de la enzima seleno-dependiente glutatión peroxidasa (GSH-Px, EC 1.11.1.9), esta contiene 4 gramos de átomo de Se por mol de enzima con un peso molecular estimado de 80.000 daltons (López y col., 1997).

El rol de la GSH-Px es reducir los RL, en especial el peróxido de hidrógeno, jugando un papel fundamental en la mantención de la integridad de la membrana celular (Church, 1995; Rotruck y col, 1973). Por ello la deficiencia de Se se refleja en una disminución de la actividad de GSH-Px, exponiendo la célula a los RL, permitiendo que éstos alteren la estructura de los lípidos, proteínas, polisacáridos, DNA y otras macromoléculas (Wittwer, 1997).

La manera como la enzima GSH-Px protege las membranas celulares es catalizando la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de glutatión reducido (GSH), el cual actúa como reductor al ceder un átomo de hidrógeno (H^+) transformándose en glutatión oxidado (GSSG) (Ceballos y Wittwer, 1996; Bondi, 1988; Ferreira, 1992). De acuerdo a la siguiente reacción general:



La inactivación a moléculas de agua, del MOR, evita los daños sobre la integridad celular producto del estrés oxidativo (Miller y col, 1993).

3.5.3 Requerimientos:

Los requerimientos de Se en la dieta de los bovinos lecheros aun no se conocen con precisión, existiendo cierto acuerdo en que los aportes de este mineral deberían estar en torno a 0,1 y 0,3 ppm. en base materia seca. En este sentido en el año 1987 el NRC aprobó que el contenido de Se en dietas para bovinos de lechería debería ser de 0,3 ppm de la materia seca, norma que aun está vigente.

En análisis realizados en muestras de forraje de la provincia de Valdivia se determinó que la concentración de selenio resultó baja para satisfacer los requerimientos nutricionales de

bovinos, con valores de $0,11 \pm 0,05$ ppm, con un rango de 0,06-0,21 ppm, confirmando esto la causa de la elevada prevalencia de rebaños selenio deficientes. En este sentido, del total de muestras analizadas un 60 % de ellas arrojaron como resultado valores menores a 0,1 ppm de selenio, que es el valor señalado por algunos autores como el mínimo requerido en el forraje para bovinos a pastoreo (Wittwer, 1997)

Considerando lo expuesto en esta introducción, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

El suministro de una dieta deficiente en selenio en bovinos disminuye la actividad de glutatión peroxidasa, disminuyendo el estado antioxidante total y por lo tanto la protección frente a un estrés oxidativo.

Con el propósito de probar esta hipótesis en el presente trabajo se fijaron los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de la deficiencia de selenio sobre la capacidad antioxidante, determinando la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y el estado antioxidante total (EAT).
2. Determinar el efecto de una deficiencia de selenio sobre el daño producido por un estrés oxidativo inducido, mediante la determinación de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE).

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1. MATERIAL

4.1.1. Animales:

Se utilizaron 12 vacas Frisón Negro, clínicamente sanas, de 4 a 6 años de edad. Estas vacas fueron adquiridas en un predio lechero de la Provincia de Valdivia, X Región, libre de Tuberculosis, Brucelosis y Leucosis, con una gestación de 7-8 meses.

4.1.2 Manejo y alimentación de las vacas:

Las vacas fueron mantenidas en dependencias del Instituto de Ciencias Clínicas de la Universidad Austral de Chile, siendo estas confinadas con sujeción individual desde aproximadamente los 30 días preparto, permaneciendo sobre piso de concreto con cama de paja, comedero individual y agua *ad libitum*. Los animales disponían de un potrero de sacrificio, cuando las condiciones climáticas permitían su uso.

Los partos ocurrieron en el transcurso del mes de Agosto. Las vacas, luego del parto permanecieron tres días con sus crías, al tercer día fueron separadas y se inició el período de ordeña, dos veces al día, con un equipo portátil de dos unidades SAC.

La ración preparto suministrada por animal, diariamente fue de 9.5 kg de heno de pradera natural (Se = 0.02ppm), más 1 kg de concentrado Cosetán® (Se = 0.12 ppm), esta ración posee un contenido de 0,03 ppm de Se.

La ración que recibieron los animales durante el periodo de la lactancia fue de 11.5 kg de heno (Se = 0.02 ppm), concentrado Cosetán® (Se=0.12 ppm) hasta 5 kg según requerimientos por producción, 0,5 kg de afrecho de soya (Se = 0,17 mg/kg), 0,5 kg de sebo para alimentación animal (Se<0,1 mg/kg), el que fue administrado desde el día 15 de la lactancia hasta finalizar el ensayo; 0,15 kg de una mezcla mineral sin selenio y urea hasta 0,12 kg, Esta ración tiene un contenido de 0.048 ppm de Se.

4.2 METODOS

4.2.1 Grupos y suplementación con Se

Los animales fueron asignados a dos grupos de 6 vacas cada uno, homogéneos en edad, peso corporal, número de partos y producción de leche de la última lactancia. Uno de los grupos seleccionado al azar se mantuvo solo con la ración deficiente (Se-D) y el otro recibió una suplementación con Se (Se-S).

Las vacas del grupo Se-S se inyectaron con 1 mg Se/kg de peso vivo, vía subcutánea, al tercer día de ingreso al hospital, utilizando un producto comercial de liberación lenta, denominado Deposel¹, en dosis de 1 ml/50 Kg.

4.2.2 Muestras y su manejo:

Los animales fueron pesados y se les tomó una muestra de sangre al tercer día de ingreso al hospital, esto fue realizado previo a la suplementación, luego cada quince días y hasta el final del ensayo se les realizó el muestreo.

Las muestras fueron obtenidas por venopunción coccígea con tubos al vacío, extrayéndose una muestra de 5 ml de sangre con heparina y otra de 5 ml sin anticoagulante por animal.

Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Patología Clínica del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias de la UACH para la determinación de la Fragilidad Osmótica Eritrocitaria (FOE) y al laboratorio de Patología Clínica de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco donde se procedió a determinar la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px, E.C 1.11.1.9), el estado antioxidante total (EAT) y las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARs).

4.2.3 Métodos analíticos

4.2.3.1 Determinación de la actividad de GSH-Px: En cada muestra de sangre se determinó la concentración de hemoglobina mediante el método de la cianometahemoglobina (Jain, 1986), y luego se hizo un hemolizado con 50 µl de sangre y 2 ml de diluyente. Los hemolizados se conservaron en microtubos a -25 °C.

La determinación de la actividad sanguínea de la GSH-Px se realizó mediante una técnica cinética compuesta NADPH-dependiente (Ceballos y col.; 1999), y de acuerdo al protocolo desarrollado para un espectrofotómetro Hitachi 4020, usando un reactivo comercial².

¹ Deposel: Young's Animal Health (NZ) Ltda.

² Ransel Laboratorios Randox, Crumlin, U.K.

4.2.3.2 Determinación del estado antioxidante total (EAT): La determinación del EAT expresado en mmol/l se realizó en las muestras de suero sanguíneo, utilizando una técnica colorimétrica empleando un reactivo comercial³, en un espectrofotómetro Hitachi 4020.

4.2.3.3 Determinación del daño lipoperoxidativo (TBARs): El daño lipoperoxidativo se evaluó mediante la concentración de TBARs en suero sanguíneo, según la metodología descrita por Alvarez y Storey (1982) y modificada por Aitken y col., (1989), en un espectrofotómetro Hitachi 4020.

4.2.3.4 Determinación de la fragilidad osmótica eritrocitaria(FOE): La FOE se evaluó a una concentración de 0,55 % de NaCl según la técnica descrita por Schalm y col., (1975), en un fotocolorímetro Boheringer 4010.

4.2.3.5. Análisis estadístico: Establecida la normalidad de los datos a través del test de Komogorov-Smirnov, se obtuvo el promedio (X) y el error estándar (E.E.) por grupo y periodo experimental. La significancia de las diferencias dentro de cada grupo, se estableció por ANDEVA y cuando este indicaba que existían diferencias se utilizó el test de Tuckey. Para la comparación de las medias entre grupos se utilizó el test de "t" (Domenech, 1980). Para el análisis de los datos se utilizó el programa computacional Graph Pad Prism, versión 3.0., empleando un nivel de confianza de 5%

³ Total antioxidant status Laboratorios Randox, Crumlin, U.K.

5. RESULTADOS

5.1. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GSH-PX

Los promedios (\pm E.E.) de la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb) previo a la suplementación fueron de 118 ± 11 en las vacas del grupo Se suplementado (Se-S) y de 110 ± 21 para las no suplementadas (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente. Estos valores de GSH-Px, previo a la suplementación, no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ambos grupos (cuadro 1).

La suplementación con selenato de bario en las vacas del grupo Se-S provocó un aumento de la actividad sanguínea de GSH-Px en relación al grupo Se-D ($P < 0,05$). Este aumento de la actividad sanguínea de GSH-Px entre grupos se observó desde los 45 días postsuplementación hasta el final de la etapa experimental (cuadro 1).

Cuadro 1: Promedio (\pm E.E.) de la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb), desde 0 a 195 días de experimentación en vacas Se suplementadas (Se-S) y no suplementadas (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente.

Días con ración Se deficiente	GSH-Px (U/g Hb)		Significancia*
	Se-S	Se-D	
0	118 \pm 11	110 \pm 21	N S
15	116 \pm 9	118 \pm 17	N.S.
30	117 \pm 13	81 \pm 16	N.S.
45	211 \pm 22	89 \pm 13	P<0,05
60	210 \pm 16	91 \pm 12	P<0,05
75	217 \pm 17	82 \pm 5	P<0,05
90	234 \pm 16	98 \pm 13	P<0,05
105	242 \pm 19	82 \pm 10	P<0,05
120	267 \pm 21	12 \pm 11	P<0,05
135	281 \pm 24	69 \pm 11	P<0,05
150	270 \pm 26	53 \pm 11	P<0,05
165	296 \pm 16	65 \pm 8	P<0,05
180	299 \pm 25	59 \pm 7	P<0,05
195	330 \pm 39	70 \pm 8	P<0,05

* "t" de Student

Los valores obtenidos en el grupo Se-S desde el día 45 postsuplementación hasta el término de la experiencia fueron significativamente mayores al del promedio inicial ($P < 0,05$) (figura 1).

En el grupo Se-D se observa que existe una tendencia a disminuir la actividad sanguínea de GSH-Px, desde valores previo a la suplementación de 110 ± 11 (U/g Hb) a un valor de 53 ± 11 (U/g Hb) a los 150 días de iniciado el experimento (figura 1).

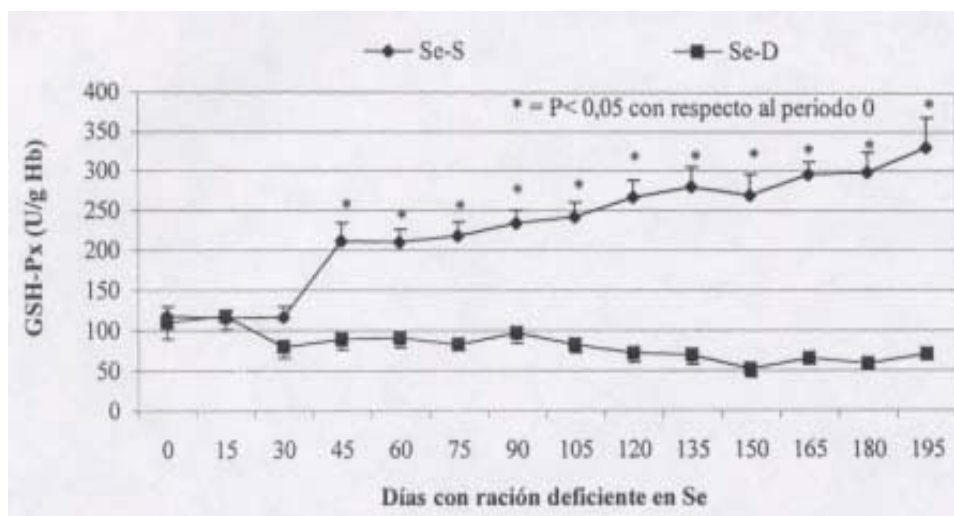


Figura 1: Variación del promedio (\pm EE) de la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb \pm EE) durante los 195 días de experimentación en vacas selenio suplementarias (Se-S) y no suplementarias (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente.

5.2 ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL (EAT)

Los valores promedio (\pm EE) del estado antioxidante total (mmol/l) previo a la suplementación en los grupos estudiados fueron de $1,09 \pm 0,07$ en el grupo Se-S y de $1,04 \pm 0,05$ para el grupo Se-D, no existiendo diferencias significativas entre ambos ($P > 0,05$) (cuadro 2).

La suplementación preparto con selenato de bario no provocó un aumento ($P > 0,05$) de la concentración promedio del estado antioxidante total entre el grupo Se-S y el Se-D (cuadro 2).

Cuadro 2: Concentración sérica promedio (\pm EE) del estado antioxidante total (mmol/l) desde los 0 a 195 días de experimentación en vacas Se suplementadas (Se-S) y no suplementadas (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente.

Días con ración Se deficiente	EAT (mmol/l)		Significancia*
	Se-S	Se-D	
0	1,10 \pm 0,07	1,04 \pm 0,05	N.S.
15	0,96 \pm 0,05	0,90 \pm 0,05	N.S.
30	1,27 \pm 0,04	1,12 \pm 0,03	P < 0,05
45	1,22 \pm 0,05	1,18 \pm 0,06	N.S.
60	1,21 \pm 0,05	1,15 \pm 0,05	N.S.
75	1,24 \pm 0,06	1,25 \pm 0,07	N.S.
90	1,25 \pm 0,05	1,16 \pm 0,07	N.S.
105	1,24 \pm 0,05	1,12 \pm 0,03	N.S.
120	0,96 \pm 0,10	0,94 \pm 0,03	N.S.
135	0,98 \pm 0,09	0,88 \pm 0,02	N.S.
150	1,18 \pm 0,04	1,15 \pm 0,05	N.S.
165	1,12 \pm 0,04	1,24 \pm 0,02	N.S.
180	1,29 \pm 0,08	1,20 \pm 0,06	N.S.
195	1,13 \pm 0,03	1,04 \pm 0,02	N.S.

* "t" de Student

En los valores obtenidos para el estado antioxidante total del grupo Se-S se observa que no existen diferencias ($P < 0,05$) entre los valores promedio de los muestreos postsuplementación con respecto a los valores previo a la suplementación (figura 2). El grupo Se-D presenta un comportamiento similar al observado en el grupo Se-S.

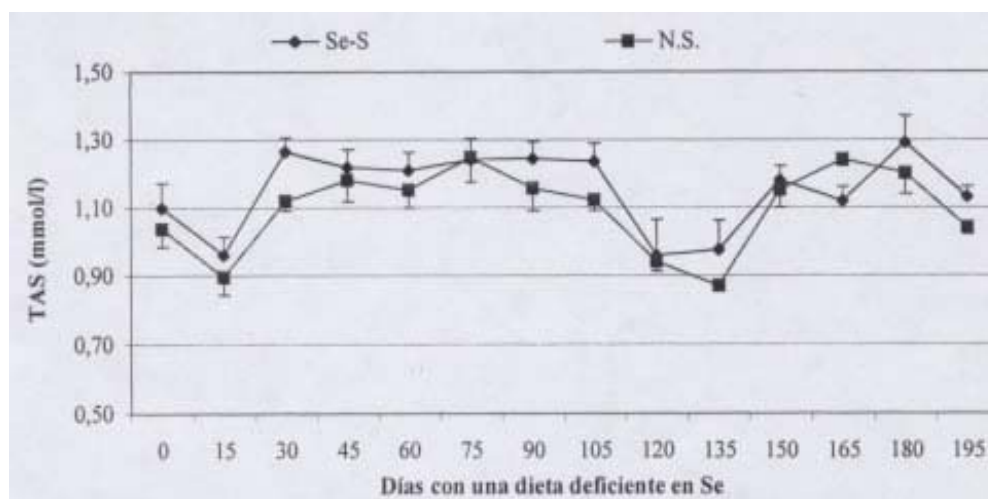


Figura 2: Variación del promedio (\pm EE) de la concentración en suero del estado antioxidante total (mmol/l) durante los 195 días de experimentación en vacas selenio suplementadas (Se-S) y no suplementadas (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente.

5.3 CONCENTRACION SERICA DE MALONALDEHIDO (TBARS)

Los promedios preparto (\pm EE) de la concentración de TBARs (ng/ml) en los grupos estudiados fueron de 214 ± 26 en el grupo Se-S y de $249,8 \pm 32$ para los del Se-D. Las diferencias entre estos promedios (\pm EE) de TBARs, previo a la suplementación, no presentan diferencias significativas ($P > 0,05$) (cuadro 3).

La suplementación preparto con selenato de bario no provocó variaciones entre los grupos estudiados ($P > 0,05$), observándose una tendencia a disminuir de manera más marcada a los 45 y 90 días postparto en el grupo Se-S, no siendo significativa esta disminución entre grupos ($P > 0,05$) (cuadro 3).

Cuadro 3: Promedio de la concentración sérica de malonaldehído (TBARs) (ng/ml \pm EE), previo al parto y suplementación (V.B.) y cada 15 días postparto, en vacas Se suplementadas (Se-S) y no suplementadas (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente.

Días postparto	TBARs (ng/ml)		Significancia *
	Se-S	Se-D	
V.B.	214 \pm 27	250 \pm 33	N.S.
15	281 \pm 19	299 \pm 42	N.S.
30	393 \pm 74	393 \pm 20	N.S.
45	315 \pm 49	379 \pm 40	N.S.
60	308 \pm 21	287 \pm 45	N.S.
75	268 \pm 70	315 \pm 41	N.S.
90	237 \pm 45	293 \pm 50	N.S.
105	245 \pm 37	265 \pm 24	N.S.
120	295 \pm 43	255 \pm 32	N.S.
135	283 \pm 58	275 \pm 52	N.S.

* "t" de Student

En el grupo Se-S el promedio (\pm EE) de la concentración de TBARs a los 30 días postparto fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que el valor basal preparto, no observándose diferencias significativas entre los otros valores. Para el caso del grupo Se-D ocurre la misma situación que en los Se-S, existiendo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el valor basal preparto y el de los 30 días postparto (figura 3).

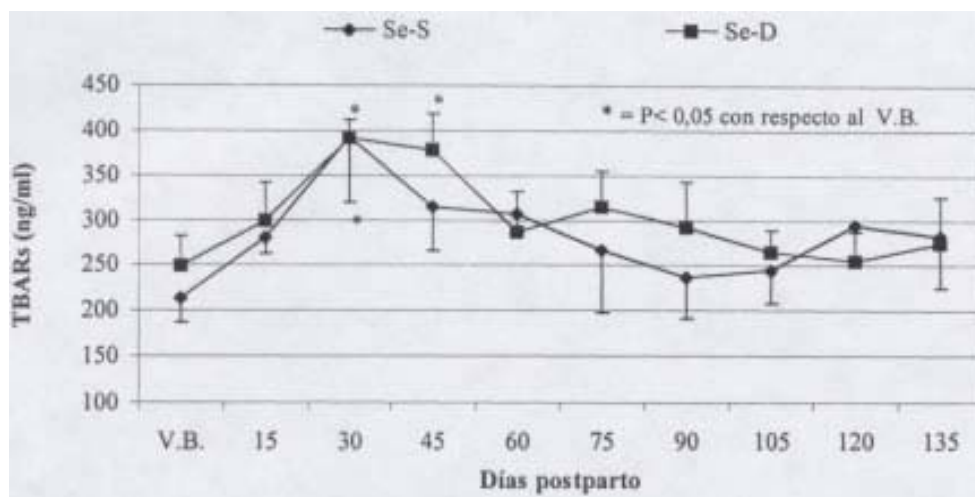


Figura 3: Variación promedio en la concentración sérica de malonaldehído (TBARs) (ng/ml \pm EE), previo al parto y suplementación (V.B.) y cada 15 días postparto, en vacas Se suplementadas (Se-S) y no suplementadas (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente.

5.4 FRAGILIDAD OSMOTICA ERITROCITARIA (FOE)

Los promedios (\pm EE) en el porcentaje de hemolisis a una concentración de 0,55 % de NaCl previo al parto en el grupo Se-S y Se-D fueron de 37 % (cuadro 4).

Los valores del porcentaje de hemolisis en el grupo Se-S varió entre 37 % y 52 % y en el grupo Se-D estos valores fluctuaron entre 33 % y 50 %. Los valores promedio de hemolisis no presentan diferencias significativas entre grupos ($P < 0,05$) (cuadro4).

Cuadro 4: Porcentaje promedio de hemolisis a una concentración de 0,55 % de NaCl, previo al parto y suplementación (V.B.) y cada 15 días postparto, en vacas setenio suplementadas (Se-S) y no suplementadas (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente.

Días postparto	% de hemolisis		Significancia *
	Se-S	Se-D	
V B	37 \pm 6	37 \pm 5	N S
15	52 \pm 6	43 \pm 10	N.S.
30	52 \pm 8	43 \pm 9	N.S.
45	43 \pm 6	40 \pm 8	N.S.
60	40 \pm 4	41 \pm 8	N.S.
75	44 \pm 6	42 \pm 5	N.S.
90	39 \pm 4	39 \pm 7	N.S.
105	43 \pm 8	37 \pm 5	N.S.
120	45 \pm 7	33 \pm 9	N.S.
135	41 \pm 10	50 \pm 11	N.S.

* "t" de Student

Los valores del porcentaje de hemólisis en el grupo Se-S no presenta diferencias significativas entre ellos, observándose que existe una tendencia a aumentar en los primeros días postparto (15-30 días), para luego disminuir alrededor del día 45 postparto (figura 4).

Los valores del porcentaje de hemólisis del grupo Se-D no presentan diferencias ($P>0,05$) entre ellos, observándose que postparto se presenta un leve aumento en el porcentaje de hemólisis (15-30 días postparto) (figura 4)

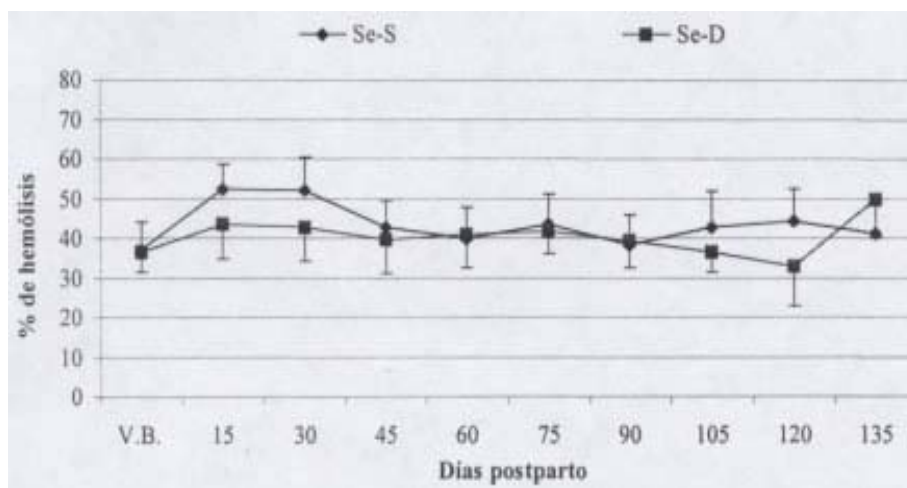


Figura 4: Variación del porcentaje promedio de hemólisis a una concentración de 0,55 % de NaCl, previo al parto y suplementación (V.B.) y cada quince días postparto, en vacas selenio suplementadas (Se-S) y no suplementadas (Se-D) mantenidas con una ración Se deficiente.

6. DISCUSION

6.1 ACTIVIDAD SANGUINEA DE GLUTATION PEROXIDASA

La actividad sanguínea de GSH-Px ($X \pm E.E.$) al inicio del estudio era de 118 ± 11 (U/g Hb) para el grupo de vacas suplementadas (Se-S) y de 110 ± 21 (U/g Hb) para las no suplementadas (Se-D), siendo estos valores considerados como marginales (101-130 U/g Hb) según Ceballos y Wittwer (1996). Estos valores iniciales de la actividad sanguínea de GSH-Px no mostraban diferencias ($P > 0,05$) entre grupos (cuadro 1).

El grupo no suplementado mantenido con una ración Se deficiente, a partir de los 30 días de iniciado el estudio presentó una tendencia a disminuir la actividad sanguínea de GSH-Px con respecto al valor basal, presentando valores considerados como bajo/marginales (61-100 U/g Hb) según Ceballos y Wittwer (1996). Los valores de GSH-Px llegaron a ser considerados como deficientes según los autores antes mencionados (< 60 U/g Hb) a los 150 días de estudio, periodo en el cual se determinó que los animales de este grupo presentaban un valor ($X \pm E.E.$) de 53 ± 11 (U/g Hb) (figura 1). La disminución de la actividad sanguínea de GSH-Px estaría dada por el consumo de una ración deficiente en selenio y no recibir una suplementación adecuada, lo que concuerda con resultados obtenidos por Whichtel y col. (1996) y Retamal (1999).

La aplicación de selenato de bario al grupo Se-S provocó un aumento ($P < 0,05$) de la actividad de GSH-Px con respecto al Se-D desde los 45 días postsuplementación (cuadro 1), esta situación es coincidente con lo descrito por otros autores (Retamal, 1999 ; Ortman y col. 1999).

La suplementación por vía subcutánea con selenato de bario en dosis de 1mg Se/kg de peso vivo, en dosis única, produjo un aumento ($P < 0,05$) de la actividad sanguínea de GSH-Px en el grupo Se-S. Este aumento se produce a partir de los 45 días postsuplementación hasta el final del estudio, manteniéndose sobre los valores indicados como adecuados (> 131 U/g Hb) por Ceballos y Wittwer (1996)(figura 1). Estos resultados que indican un aumento de la actividad de GSH-Px son concordantes con los informados por otros autores (Oblitas, 2000; Ortman y col, 1999; Enjalbert y col., 1999; Retamal, 1999).

Los animales de ambos grupos en estudio, presentaban las mismas condiciones de manejo y alimentación, lo que hace atribuir el aumento de la actividad de GSH-Px a la suplementación con selenato de bario (1 mg Se/kg peso vivo) de liberación lenta en dosis única.

El aumento de la actividad de GSH-Px posterior a la suplementación con selenio, nos indica la eficacia del producto utilizado en la prevención de una deficiencia de Se para animales con las características señaladas y bajo las condiciones de este estudio.

6.2 ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL (EAT)

La administración de una ración deficiente en Se al grupo Se-S y Se-D no provocó diferencias ($P>0,05$) en los valores del EAT entre grupos (cuadro 2); lo mismo ocurrió dentro de cada grupo, donde no se observó diferencias ($P>0,05$) en los valores obtenidos.

Los valores de EAT según lo expresado por Randox (1994) no discrimina entre las distintas sustancias antioxidantes, sino que las considera como un todo.

6.3 CONCENTRACION SERICA DE MALONALDEHIDO (TBARS)

La utilización de una dieta deficiente en Se no provocó diferencias ($P>0,05$) en la concentración sérica de malonaldehído entre los grupos Se-S y Se-D (cuadro 3), sugiriendo esto que existe un mecanismo independiente de GSH-Px para controlar los efectos del estrés oxidativo. En este sentido los resultados de esta experiencia concuerdan con lo obtenido por Wang y col. (1996) que indica que los niveles de TBARs no cambian en respuesta a la suplementación con Se.

Las concentraciones de TBARs, señalan que en ambos grupos existe un aumento de la lipoperoxidación hasta los 30 días postparto, disminuyendo luego en el Se-S a los 45 días postparto y en los Se-D a los 60 días postparto ($P>0,05$) (figura 3), siendo interesante evaluar esta tendencia a disminuir más tarde en el grupo Se-D ya que es en este periodo que la vaca tiene sus mayores exigencias biológicas (Miller y col, 1993).

6.4 FRAGILIDAD OSMOTICA ERITROCITARIA (FOE)

Al comparar el porcentaje de hemólisis del grupo Se-S con respecto al Se-D, a una concentración de 0,55 % de NaCl, para cada periodo, no se encontraron diferencias ($P>0,05$) entre los valores observados (cuadro 4).

La administración de una dieta deficiente en Se no provoca diferencias ($P>0,05$) dentro de cada grupo (figura 4), por lo que el test de la FOE no muestra un efecto de la ración Se deficiente sobre la integridad de la membrana de los eritrocitos. Esta conclusión es similar a la planteada por Gutzwiller (1998), quien expresa que la GSH-Px tiene una importancia secundaria en la protección de los lípidos de la membrana de los eritrocitos.

Conclusiones

- El uso de una dieta deficiente en Se en bovinos lecheros provoca una disminución de la actividad sanguínea de GSH-Px a los 45 días de iniciado su uso, llegando a niveles considerados deficientes a los 5 meses.
- La suplementación en dosis única a vacas lecheras con selenato de bario provoca un aumento de la actividad de GSH-Px a los 45 días, persistiendo por lo menos durante seis meses.
- La utilización de la dieta deficiente en Se empleada en el experimento así como su suplementación no afectan el estado antioxidante total en bovinos Frisón Negro.
- El uso de una dieta deficiente en Se no produce un aumento de la lipoperoxidación ni de la FOE con respecto a los animales mantenidos con la misma dieta y suplementados con Se.
- La lipoperoxidación producida como consecuencia del estrés oxidativo en vacas se incrementa entre los 30 y 45 días postparto.

7. BIBLIOGRAFIA

AITKEN, R. J., J. S. CLARKSON, S. FISHEL. 1989. Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Human Sperm Function. *Biol. Repr.* 40:183-197.

ALVAREZ, J. G., B. T. STOREY. 1982. Spontaneous Lipid Peroxidation in Rabbit Epididymal Spermatozoa: Its Effect on Sperm Mobility. *Biol. Repr.* 27: 1102-1108.

AMMERMAN, R. A. Y W. J. MILLER 1975. Selenium in ruminant nutrition. *J. Dairy Sci.* 58: 1561-1577.

ASPILA, P. 1991. Metabolism of selenite, seleniomethionine and feed-incorporated selenium in lactating goats and dairy cows. *J. Agr. Sci. Fin.* 63: 1-69.

BARQUINERO, J. 1992. Un ejercito de radicales libres en acción. En: **CRYSTAL, R.G. y J.R. RAMON. 1992** Glutación: eje de la defensa antioxidante. Excerpta Medica Medical Communications. B.V. Amsterdam.

BONDI, A. A. 1988. Nutrición animal. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España.

BURK, R. F. 1991. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J.* 5: 1221-1227.

CEBALLOS, M. A., F. G. WITTWER. 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 28:Nº2;5-18.

CEBALLOS, M.A., F. G. WITTWER, P. A. CONTRERAS, E. QUIROZ, H. L. BOHMWALD. 1999. Actividad de Glutación Peroxidasa en Bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesq. Agropec. Eras.* 34:2331-2338.

CHAUDIERE, J., R. FERRARI-ILOU. 1999. Intacellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.* 37: 949-942.

CHEESEMAN, K.H., T. F. SLATER. 1993. An introduction to free radical biochemistry. En **CHEESEMAN, K.H., T. F. SLATER. 1993.** Free Radicals in Medicine. *Br. Med. Bull.* 49:481-493.

CHURCH, D. 1995. Basic Animal Nutrition and Feeding. John Wiley & sons inc.. U.S.A.

CONRAD, H. R. Y L. MOXON. 1979. Transfer of dietary selenium to milk. *J. Dairy Sci.* 62: 404-441.

DOMENECH, J. M. 1980. Bioestadística. 3^{ra} ed. Editorial Herder, Barcelona, España.

EDWARDS, C.J., J. FULLER. 1996. Oxidative stress in erythrocytes. *Comp. Haematol. Int.* 6:24-31.

ENJALBERT, F., P. LEBRETON, O. SALAT, F. SCHELCHER. 1999. Effects of Pre- or Postpartum Selenium Supplementation on Selenium Status in Beef Cows and Their Calves. *J. Anim. Sci.* 77: 223-229.

FERREIRA, A. 1992. Minerais na nutricao da rumiantes. **Informe Agropecuario.** 175: 16-23.

FISHER, L. J., C. HOOGENDOORN, J. MONTE-MURRO. 1980. The effect of added dietary selenium on the selenium content of milk, urine and feces. *Can. J. Anim. Sci.* 60:79-86. Citado por **CEBALLOS, M. A., F. G. WITWER. 1996.** Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 28: N° 2; 5-18.

GARNER, 1970. Toxicología Veterinaria. Ed. Acribia, Zaragoza. España.

GEORGIEVSKII, V. L, N. ANNENKOW, V. T. SAMOKHIN. 1981. Mineral Nutrition of Animals. Ed. Butterworth and Co. Ltda. London, England.

GERLOF, B. 1992. Effect of Selenium supplementation on dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 3934-3940.

GUTZWILLER, A. 1998. Eritrocyte Resistance to Oxidative Damage and Leucocyte Capacity to Reduce Nitroblue Tetrazolium in Selenium-Deficient Cattle. *J. Vet. Med. A.* 45:271-278.

HALLIWELL, B. 1987. Oxidants and human disease some new concepts. *FASES J.* 1: 358-364.

HALLIWELL, B., B. J.M. GUTTERIDGE Y C.E. CROSS. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620.

HALLIWELL, B., S. CHIRICO. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57(suppl): 715s-725s.

HARRIS, E. D. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *J. Nutr.* 122:625-626.

HENRY, J. H., M. G. ECHEVARRÍA, C. B. AMMERMAN Y P. V. RAO. 1988. Estimation of the relative biological availability of inorganic selenium sources for ruminants using tissue uptake of selenium. *J. Anim. Sci.* 66:2306-2312.

HIDIROGLOU, M. Y K. JENKINS. 1973. Absorption of Se⁷⁵-selenomethionine from the rumen of sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 53: 345-347.

JAIN, N. C. 1986. Schalm's Veterinary Hematology. 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia. USA

KEHRER, J.P. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23:21-48.

LARKINS, N. J. 1999. Free radical biology and pathology. *J Equine Vet. Sci.* 19: 84-89.

LEVANDER, O. A. 1986. Selenium. En: **MERTZ, W. 1986.** Trace elements in human and animal nutrition. Vol. 2. 5*. Ed., Academic Press, Inc. Orlando. USA.

LOPEZ ALONSO, M., M. MIRANDA, J. HERNANDEZ, C. CASTILLO, J. L. BENEDITO. 1997. Glutación peroxidasa en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 29: 171-179.

LUNEC, J. 1996. Oxidative stress and antioxidants. Proceedings of the Vllth Congress of the International Society for Animal Clinical Biochemistry, Gasgow, UK, pp, 45.

MACHLIN, L.J., A. BENDICH. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *PASEE J.* 1: 441-445.

MATES, J. M., C. PEREZ-GOMEZ, I. NUÑES De CASTRO. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32: 595-603.

MAXWELL, S.R.J. 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* 49: 345-361. 1995

MILLER, J. K., E. BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, F.C. MADSEN. 1993 Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J. Dairy Sci.* 76: 2812-2823.

MORRISEY, P. A., N. M. O'BRIEN. 1998. Dietary antioxidants in helth and disease, *Int. Dairy J.* 8: 463-472.

OBLITAS, F., P. A. CONTRERAS, H. BÓHMWALD, F. WITTWER. 2000. Efecto de la suplementación con selenio en la actividad sanguínea de glutación peroxidasa y ganancia de peso en bovinos deficientes a pastoreo, *Arch. Med. Vet.* 32: 55-62.

ORTMAN, K., R. ANDERSSON, H. HOLST. 1999. The Influence of Supplements of Selenite, Selenate and Selenium Yeast on the Selenium Status of Dairy Heifers. *Acta Vet Scand.* 40: 23-34.

PATTERSON, E. L., R MILSTREY, E. L. R. STOKSTAD. 1957. Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks. *Proceedings of the society for experimental Biology and Medicine*, 95:617-620. Citado por: **UNDERWOOD, E. J. 1987.** Los minerales en la nutrición del ganado. 2ª ed., Editorial Acribia, Zaragoza. España.

RANDOX. 1994. Free radicals. Radox Laboratories Ltd. Crumlin, U.K.

RETAMAL, F. 1999. Evaluación de la suplementación con bolos intraruminales de selenio en vaquillas a pastoreo. Tesis, Licenciatura en Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

RIMBACH, G., D. HOHLER, A. FISCHER, S. ROY, F. VIRGILI, J. PALLAUF, L. PACKER. 1999. Methods to asses free radicals and oxidative stress in biological systems, *Arch. Anim. Nutr.* 52: 203-222.

ROTRUCK, J. T., A. L. POPE, H. E. GANTHER, A. B. SWANSON, D. G. HAFEMAN, W. G. HOEKSTRA. 1973. Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*,. 179: 588-590. Citado por: **UNDERWOOD, E. J. 1987.** Los minerales en la nutrición del ganado. 2ª ed., Editorial Acribia, Zaragoza. España.

SCHALM, O. W., N. C. JAIN, E. J. CARROL. 1975. Veterinary Hematology. 3ª ed., Lea and Febiger, Philadelphia. USA.

SCHWARZ, K. Y C. M. FOLTZ. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of American Chemical Society*. 79: 3292-3293. Citado por: **UNDERWOOD, E. J. 1987.** Los minerales en la nutrición del ganado. 2ª ed., Editorial Acribia, Zaragoza. España.

SLATER, T. F. 1984 Free-radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.* 222: 1-15.,

SYMONDS, H. W., B. F.SANSOM, D. L. MATHER, M. J. VAGG. 1981. Selenium metabolism in the dairy cow: the influence of form and amount of Se salt. *Br. J. Nutr.* 45: 117-125.

UNDERWOOD, E. J. 1987 Los minerales en la nutrición del ganado. 2ª ed., Editorial Acribia, Zaragoza. España.

VAN SAUN,R. J., T. H. HERD, H. D. STOWE. 1989. Maternal and fetal selenium concentrations and their interrelationships in dairy cattle. *J. Nutr.* 119:1128-1137.

WANG, y. H., J. LEIBHOLZ, W. L, BRYDEN, D. R. FRASER. 1996. Lipid peroxidation status as Index to evaluate the influence of dietary fats on vitamin E requirements of young pigs. *BrJ. Nutr.* 75: 81-95.

WICHTEL, J. J., A. L. CRAIGIE, D. A. FREEAN, H. VARELA-ALVAREZ, N. B. WILLIAMSON. 1996. Effect of selenium and iodine supplementation on growth rate and on thyroid and somatotropic function in dairy calves at pasture. *J. Dairy Sci.* 79: 1865-1872.

WITTWER, F. 1997.Antecedentes del balance nutricional del selenio en Chile y su suplementación en el ganado. En: Estrés oxidativo y antioxidantes en la salud y nutrición animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, pp. 27-35.

YU, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74: 139-162.

Anexo 1: Valores de la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb) en vacas Se suplementadas mantenidas con una ración Se deficiente.

Días con ración Se deficiente														
Vacas	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195
1	137,4	107,0	106,8	166,0	139,9	137,6	199,0	198,2	225,0	217,6	226,9	268,1	258,6	277,7
2	74,5	135,3	82,3	252,7	236,4	234,8	222,5	230,3	245,9	286,9	216,2	286,4	284,8	256,1
3	155,7	142,9	170,6	214,7	226,7	253,1	305,4	332,4	365,0	369,6	374,3	357,2	419,0	360,9
4	99,9	124,6	97,1	131,4	249,5	241,9	214,3	220,3	237,1	238,5	252,4	283,4	285,5	486,3
5	114,2	85,6	142,2	280,3	218,9	235,2	207,1	226,4	240,5	241,5	226,7	253,7	252,1	227,2
6	129,1	98,8	105,4	222,9	190,6	204,0	255,0	243,8	288,4	329,2	321,9	325,2	292,6	370,6
Prom.	118,5	115,7	117,4	211,3	210,3	217,8	233,9	241,9	267,0	280,5	269,7	295,7	298,8	529,5
E.E.	11,8	9,1	13,3	22,4	16,2	17,4	16,3	19,1	21,5	24,2	26,1	15,7	24,9	39,1

Anexo 2: Valores de la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb) en vacas no suplementadas mantenidas con una ración Se deficiente.

Días con ración Se deficiente														
Vacas	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195
1	153,4	156,9	121,6	138,3	195,0	139,5	207,1	128,0	115,0	125,6	94,0	101,9	89,7	102,1
2	173,8	153,9	125,0	101,7	117,3	86,4	130,8	79,0	92,3	57,4	44,2	59,8	61,6	56,7
3	141,3	153,3	61,1	90,9	68,9	83,4	74,3	68,5	59,3	59,1	42,0	56,3	59,7	83,3
4	72,0	63,2	55,7	87,3	67,6	101,7	85,1	71,3	57,3	61,1	39,8	63,4	47,6	62,8
5	46,4	92,9	30,1	42,1	121,4	65,9	70,5	60,6	39,0	47,7	21,9	45,3	42,1	50,8
6	75,6	87,5	91,3	74,6	81,0	76,4	126,9	87,0	70,8	64,7	73,8	64,1	55,7	67,2
Prom	110,4	118,0	80,8	89,1	97,2	82,8	97,5	82,4	72,3	69,3	52,6	65,7	59,4	70,5
E.E	21,3	16,9	15,6	12,9	11,7	5,9	13,0	9,8	11,2	11,5	10,7	7,9	6,8	7,8

Anexo 3: Valores de la concentración sérica del estado antioxidante total (mmol/l) en vacas Se suplementadas mantenidas con una ración Se deficiente.

		Días con ración Se deficiente													
Vacas	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	
1	1,32	1,14	1,30	1,43	1,43	1,41	1,39	1,48	1,36	1,39	1,15	0,97	1,31	1,05	
2	1,06	1,05	1,41	1,19	1,07	1,25	1,23	1,12	0,90	0,86	1,14	1,05	1,25	1,13	
3	1,12	0,95	1,25	1,14	1,30	1,29	1,39	1,19	1,10	0,98	1,14	1,22	1,23	1,10	
4	1,10	0,99	1,25	1,27	1,18	0,96	1,18	1,23	0,62	0,92	1,13	1,12	1,02	1,24	
5	1,20	0,79	1,28	1,22	1,16	1,29	1,17	1,16	0,97	0,89	1,13	1,25	1,65	1,25	
6	0,79	0,85	1,10	1,05	1,11	1,25	1,11	1,24	0,81	0,82	1,40	1,10	1,30	1,15	
Prom.	1,10	0,96	1,27	1,22	1,21	1,24	1,25	1,24	0,96	0,98	1,18	1,12	1,29	1,15	
E.E.	0,07	0,05	0,04	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,1	0,09	0,04	0,04	0,08	0,03	

Anexo 4: Valores de la concentración sérica del estado antioxidante total (mmol/l) en vacas no suplementadas mantenidas con una ración Se deficiente.

		Días con ración Se deficiente													
Vacas	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	
1	1,22	1,09	1,22	0,98	1,20	0,93	1,13	1,26	0,97	0,91	1,29	1,25	1,39	1,09	
2	0,93	0,89	1,03	1,08	0,97	1,33	1,01	1,09	1,01	0,85	1,08	1,18	1,15	1,06	
3	0,87	0,96	1,12	1,23	1,09	1,28	1,05	1,04	0,92	0,90	1,08	1,34	1,07	0,97	
4	1,16	0,71	1,04	1,12	1,14		1,04	1,06	0,88	0,81	0,97	1,24	1,02	1,03	
5	1,02	0,90	1,15	1,24	1,16	1,38	1,33	1,14	0,85	0,87	1,30	1,20	1,29		
6	1,03	0,84	1,16	1,43	1,34	1,32	1,38	1,14	1,02	0,89	1,16	1,20	1,29		
Prom.	1,04	0,90	1,12	1,18	1,15	1,25	1,16	1,12	0,94	0,87	1,15	1,24	1,20	1,04	
E.E.	0,05	0,05	0,03	0,06	0,05	0,07	0,07	0,03	0,03	0,02	0,05	0,02	0,06	0,02	

Anexo 5: Valores de la concentración sérica de malonaldehído (TBARs) en vacas Se suplementadas mantenidas con una ración Se deficiente.

Vacas	Días postparto									
	V. Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	135
1	168,47		135,4	358,7	218,1	185	242,9	226,4	176,7	457,9
2	201,55	342,1	367	110,6	350,4	118,9	143,7		325,6	168,5
3	342,14	267,7	400	325,6	284,3	350,4	102,3	176,7	176,7	193,3
4	193,28	234,6		400	317,3		201,6	383,5	375,2	383,5
5	209,82	300,8	565,4	251,2	358,7	416,6	358,7	242,9	433,1	
6	168,47	259,4	499,3	441,4	317,3		375,2	193,3	284,3	212,1
Prom.	213,96	281	393	375	308	268	237	245	295	283
E.E.	26,56	18,6	73,5	48,7	21	69,5	45,5	36,7	42,6	57,8

Anexo 6: Valores de la concentración sérica de malonaldehído (TBARs) en vacas no suplementadas mantenidas con una ración Se deficiente.

Vacas	Días postparto									
	V. Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	135
7	226,36	375,2	375,2	276	375,2	325,6	193,3	234,6	400	209,8
8	267,71	267,7	375,2		151,9	276	358,7	292,5	168,5	251,2
9	234,63	317,3	400	333,9	201,6	482,7	168,5	226,4	251,2	482,7
10	185,01	383,5	338,7	499,3	441,4	325,6	499,3	375,2	259,4	143,7
11	400,03		383,5	441,4	309,1	176,7	300,8	226,4	201,6	367
12	185,01	151,9	482,7	342,1	242,9	300,8	234,6	234,6	251,2	193,3
Prom.	249,79	299	393	579	287	315	295	265	255	275
E.E.	32,69	42,4	19,8	40,2	44,6	40,5	50,3	24,3	32,4	51,8

Anexo 7: Valores del porcentaje de hemolisis a una concentración de 0,55 % de NaCl en vacaste suplementadas mantenidas con una ración Se deficiente.

Vacas	Días postparto									
	V. Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	135
1	46	35	31	30	27	38	28	24	25	77
2	25	63	50	61	38	53	32	64	38	26
3	45	54	59	45	43	38	52	49	66	48
4	49	68	78	46	51	27	36	23	41	20
5	20	42	43	33	41	62	45	54	53	36
6										
Prom,	37	52	52	43	40	44	39	43	45	41
E.E.	6	6	8	6	4	6	4	8	7	10

Anexo 8: Valores del porcentaje de hemolisis a una concentración de 0,55 % de NaCl en vacas no suplementadas mantenidas con una ración Se deficiente.

Vacas	Días postparto									
	V. Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	135
1										
2	43	57	60	57	38	46	22	35	25	30
3	40	52	61	43	45	52	53	52	64	82
4	47	66	48	56	64	42	51	39	37	35
5	34	12	14	15	12	25	22	22	14	30
6	19	31	31	28	46	44	49	35	25	72
Prom.	37	44	43	40	41	42	39	37	33	50
E.E.	5	10	9	8	8	5	7	5	9	11

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que de una u otra forma participaron en la elaboración de este trabajo y en especial a:

- Dr. Fernando Wittwer M.
- Dr. Pedro Contreras B.
- Dr. Ricardo Chihuailaf V.
- Sra Helga Böhmwald L.
- Sra. Helia Ludwig A.
- Sr. Atilio Delgado P.
- Sita. Catalina Román B.
- Armin Ramírez D.
- Sr. Rodrigo Monroy R.