

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS CLINICAS VETERINARIAS**

**EVALUACION DEL DAÑO OXIDATIVO EN ERITROCITOS DE BOVINOS A  
PASTOREO CON BAJO CONTENIDO DE SELENIO Y SUPLEMENTADOS CON  
SELENIO Y  $\alpha$ -TOCOFEROL.**

**Memoria de Titulo presentada  
como parte de los requisitos  
para optar al TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO.**

**CECILIA VERONICA GONZALEZ HUBERT**

**VALDIVIA – CHILE**

**2005**

**PROFESOR PATROCINANTE**

Dr. Pedro A. Contreras B.

**PROFESOR COLABORADOR**

Dr. Fernando Wittwer M.

**PROFESORES CALIFICADORES**

Dr. Santiago Ernst M.

Dr. Rubén Pulido F.

**FECHA DE APROBACION**

14 de Noviembre del 2005

## INDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMARRY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODOS	9
5. RESULTADOS	12
6. DISCUSION	19
7. BIBLIOGRAFIA	23
8. ANEXOS	27
9. AGRADECIMIENTOS	31

*A Elizabeth y Beatriz por su constante apoyo y cariño*

## 1. RESUMEN

Para estudiar la participación del selenio y del  $\alpha$ -tocoferol en la protección de las membranas al daño provocado por el estrés oxidativo, se utilizaron 24 vaquillas frisón negro, asignadas al azar a cuatro grupos experimentales de seis animales cada uno: grupo control (Se-T-), grupo suplementado con selenio (Se+T-), suplementado con  $\alpha$ -tocoferol (Se-T+) y suplementado con selenio y  $\alpha$ -tocoferol (Se+T+). La suplementación con selenio se realizó vía subcutánea, en dosis 1 mg Se/kg de peso vivo, utilizando el producto comercial Deposel® (Deposel®, Young's Animal Health, New Zeland). La suplementación con  $\alpha$ -tocoferol se realizó por vía subcutánea, en dosis de 500 UI/100 kg de peso vivo utilizando el producto comercial Vital E-300® (Shering Plough, USA). Los animales fueron mantenidos a pastoreo en forrajes con antecedentes de bajo contenido de selenio durante el periodo de estudio. Muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción yugular antes de la suplementación (valor inicial) y posteriormente en forma quincenal en octubre y noviembre y mensualmente en diciembre y enero. Para evaluar el efecto de la suplementación se determinó la actividad sanguínea de GSH-Px, la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol, la fragilidad osmótica eritrocitaria y la lipoperoxidación de eritrocitos *in vitro*. Las diferencias entre y dentro de grupos se establecieron mediante análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey, y las asociaciones entre las variables se establecieron mediante la prueba de Pearson. El nivel de significación empleado fue de 5%.

La actividad sanguínea de GSH-Px en los grupos suplementados con selenio incrementó ( $P < 0,05$ ), alcanzando valores adecuados, lo que no ocurrió en el grupo sin suplementación. La concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en los grupos suplementados (Se-T+ y Se+T+) fue similar al control (Se-T-), los valores promedios estuvieron dentro del rango considerado adecuado por la literatura. La fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) y la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) tampoco mostró diferencia ( $P > 0,05$ ) entre los grupos en estudio.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la suplementación con selenio aumentó la actividad sanguínea de GSH-Px y que la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol no modificó la concentración plasmática de ésta. Se estableció una baja correlación entre la actividad eritrocitaria de GSH-Px y la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol con la FOE y la producción de TBARS, los coeficientes de correlación también fueron bajos.

Palabras clave: eritrocitos, bovino, estrés oxidativo,  $\alpha$ -tocoferol, selenio.

## 2. SUMMARY

### **Evaluation of oxidative damage in erythrocytes bovine fed low selenium content pastures and supplied with selenium and $\alpha$ -tocopherol.**

To determine the effect of selenium and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on the erythrocyte susceptibility to oxidative damage, 24 Friesian heifers grazing pasture that had a low selenium concentration were randomly assigned to four experimental groups each: untreated control group (Se-T-), selenium supplemented group (Se+T-),  $\alpha$ -tocopherol supplemented group (Se-T+), and selenium and  $\alpha$ -tocopherol supplemented group (Se+T+).

The selenium supplementation was done s. c. with 1 mg Se/kg b. w., using the commercial product Deposel® (Deposel®, Young's Animal Health, New Zealand). The  $\alpha$ -tocopherol supplementation was done s. c. with 500 UI/100 kg b. w., using the commercial product Vital E-300® (Shering Plough, USA). Blood samples were collected from the jugular vein just prior to supplementation (initial value) and then at predetermined intervals; every fifteen days in October and November, and once a month in December and January. To evaluate the effect of supplementation, GSH-Px blood activity, plasmatic concentration of  $\alpha$ -tocopherol, erythrocyte osmotic fragility and erythrocytes lipid peroxidation *in vitro* were determined. The differences in and between the groups were established by analysis of variance (ANOVA) and the Tukey multiple comparison test. The associations between the variables were established by performing a Pearson test. A 5% significant level was used.

Erythrocyte GSH-Px blood activity incremented in the selenium supplemented groups ( $P < 0.05$ ), attaining adequate values. This did not happen with the not supplemented group. The plasma  $\alpha$ -tocopherol concentration of the supplemented groups (Se-T+ y Se+T+) was similar to the control group (Se-T-). The average values were within the range considered adequate by literature. The erythrocyte osmotic fragility (FOE) and the thiobarbituric acid reaction substances (TBARS) production did not show statistical differences ( $P < 0.05$ ) between groups.

The results obtained allow to conclude that the selenium supplementation increased the GSH-Px blood activity and that the  $\alpha$ -tocopherol supplementation did not modify its own plasmatic concentration. It was possible to establish a low correlation between GSH-Px erythrocyte activity and plasmatic concentration of  $\alpha$ -tocopherol with FOE and with the production of TBARS, and the correlation coefficients were low too.

Key words: erythrocyte, bovine, oxidative stress,  $\alpha$ -tocopherol, selenium.

### 3. INTRODUCCION

Los desbalances nutricionales provocan un efecto negativo en la salud del rebaño, es así que bajas concentraciones de minerales y vitaminas en el animal pueden afectar de forma evidente o casi imperceptible, predisponiendo a cuadros patológicos que inciden directa o indirectamente en la producción (Wittwer y col 1988).

El selenio es un mineral esencial para el mantenimiento y desarrollo de las funciones del organismo animal. Este mineral forma parte de la enzima glutatión peroxidasa (Oblitas y col 2000), metaloenzima que entre sus funciones está la de inactivar algunos radicales libres derivados del oxígeno que se forman en el organismo como consecuencia del metabolismo aerobio (Ceballos y col 1999). La deficiencia metabólica de selenio provoca una disminución en la actividad de GSH-Px, que se asocia a una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y consecuentemente a diversos síndromes asociados a su déficit nutricional (Oblitas y col 2000). En las praderas del sur de Chile se ha establecido que existe una deficiencia en el aporte de selenio por los forrajes (Wittwer y col 1988, Wittwer 1997) y se han descrito deficiencias de selenio en animales mantenidos a pastoreo (Ceballos y col 1998), es por ello que se han hecho diversos estudios en rebaños lecheros de esta región.

La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), también participa en el control de los radicales libres, el efecto antioxidante de esta vitamina es importante en la integridad de las membranas celulares (Brigelius-Flohé y Traber 1999). Esta es una vitamina liposoluble que, entre otros, se encuentra en el aceite de oliva, germen de maíz, trigo y cebada y en vegetales de hojas verdes (Pond y col 2002), es por eso que su contenido en los forrajes disminuye en invierno y aumenta en primavera, cuando hay mayor crecimiento de los pastos. Además de su función de control de los radicales libres, participa en el metabolismo de los ácidos nucleicos, proteínas y mitocondrias (Wang y Quinn 1999). Las manifestaciones de la deficiencia de la vitamina E son variadas, pero pueden dividirse en tres grandes grupos: problemas reproductivos, lesiones musculares y alteraciones de las membranas celulares (Pond y col 2002).

Ambos nutrientes participan en el organismo como antioxidantes para controlar el daño provocado por el estrés oxidativo.

### 3.1 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es una alteración que se produce debido a un desequilibrio entre la generación de radicales libres (RL) y la capacidad antioxidante (AO) del organismo, lo que puede provocar daño (Kehrer 1993, Lunec 1996). La presencia de daño es producto de un aumento de los RL ó por una disminución de los AO.

El estrés oxidativo también se describe como el resultado de una deficiencia de sustancias protectoras naturales o de una excesiva exposición a agentes generadores de RL, en otras palabras, el estrés oxidativo se desencadena cuando los prooxidantes (RL) exceden la capacidad AO de un organismo (Miller y col 1993).

### 3.2 RADICALES LIBRES

Un RL se define como cualquier especie química de existencia independiente que posea uno o más electrones desapareados (o sea, un número impar) girando en sus orbitales atómicos externos (Cheeseman y Slater 1993, Larkins 1999). Esta configuración, al ser químicamente inestable, hace que sea una especie altamente reactiva y de corta vida (Chihuilaf y col 2002).

Un RL se puede originar por distintos mecanismos; en los organismos vivos la forma más frecuente es mediante la adición de un electrón a una molécula estable (Cheeseman y Slater 1993), una vez formados, estos interactúan con otras moléculas (con reacciones de oxido-reducción) con el propósito de alcanzar una configuración electrónica estable. En estas reacciones ocurre una transferencia de electrones, una de ellas cede electrones (oxidación) y la otra los recibe (reducción). Cuando un RL reacciona con una molécula, ésta se transforma en un RL, esto produce una reacción en cadena que se detiene sólo cuando dos RL se encuentran (Halliwell y Chirico 1993).

Los RL pueden ser de origen endógeno o exógeno, y oxidar o reducir (Slater 1984). Estos cumplen un rol importante en varios procesos homeostáticos esenciales para la vida como intermediarios en reacciones de óxido-reducción. La fosforilación oxidativa, la destrucción de microorganismos fagocitados, la síntesis de mediadores de la inflamación y la detoxificación constituyen algunos ejemplos de relevancia. Las concentraciones bajas de RL son beneficiosas e indispensables, sin embargo, en cantidades excesivas son tóxicas, ya que al oxidar moléculas biológicas las alteran desencadenando trastornos en el metabolismo celular (Chow 1979 Larkins 1999).



### 3.3 ANTIOXIDANTES

Dado que los RL son producidos constantemente durante los procesos metabólicos, la célula ha desarrollado un sistema de defensa que limita la exposición a estos agentes, estas sustancias que componen el sistema de defensa se les conoce como antioxidantes (AO) y se definen como moléculas que previenen la formación en forma descontrolada de RL o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas (Yu 1994).

Los AO, para dar el máximo de protección, se distribuyen en membranas, citoplasma y preferentemente en los organelos, ya que aquí es donde se genera la mayor cantidad de RL por sus roles metabólicos e intensidad de sus actividades (Cheeseman y Slater 1993).

Muchos de los AO son enzimas, nutrientes esenciales o incorporan nutrientes esenciales en su estructura molecular (Machlin y Bendich 1987). Existen diferentes clasificaciones para los AO. Cheeseman y Slater (1993) y Miller y col (1993) los clasifican basándose por el mecanismo mediante el cual ejercen su acción protectora, agrupándolos en aquellos que cumplen un rol preventivo en la formación de RL y en los que interceptan a los que ya se han producido. Larkins (1999) los clasifica según su localización en intra o extra celulares y también en enzimáticos y no enzimáticos.

#### 3.3.1 Antioxidantes no enzimáticos

Los AO no enzimáticos corresponden a un grupo heterogéneo de moléculas que capturan RL dando origen a especies químicas menos nocivas para la integridad celular (Bandyopadhyay y col 1999), cuyo mecanismo de acción es la donación de un electrón a un RL con la finalidad de estabilizarlo (Larkins 1999). Dentro de esta categoría está la vitamina E, que tiene ocho isómeros, de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol es el de mayor potencia AO. Su acción la desarrolla en las membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplasmático liso) (Chihuaif y col 2002); esta actividad, implica que el  $\alpha$ -tocoferol se transforme al RL tocoferoxilo que posteriormente vuelve a su estado nativo a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas A y C (Wang y Quinn 1999).

#### 3.3.2. Antioxidantes enzimáticos

Los AO enzimáticos catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Luego estos sustratos o agentes reductores deben regenerarse para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías metabólicas (Chaudière y Ferrari Iliou 1999). La glutatión peroxidasa (GSH-Px) pertenece a la categoría de AO enzimáticos. GSH-Px es una selenoproteína que se ubica en la matriz mitocondrial y en el citoplasma, ésta, en presencia de GSH como agente reductor, cataliza la

reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos, a agua y alcohol (Chihuilaf y col 2002). Es aquí donde el selenio tiene su participación como AO, ya que la GSH-Px tiene selenio incorporado en su estructura molecular y se ha demostrado que existe una alta correlación entre su concentración sanguínea y la actividad de GSH-Px (López Alonso y col. 1997, Ceballos y col 1999).

### **3.4 ALTERACIONES ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo ha sido implicado en la etiopatogenia de numerosos trastornos (Kehrer 1993), en procesos como el envejecimiento (Dröge 2002) y en el incremento de la apoptosis celular (Leyán 1997, Bandyopadhyay y col 1999).

En animales de compañía se han identificado numerosas alteraciones cuya incidencia disminuye al suplementar con AO; por ejemplo, en caninos y felinos una dieta deficiente en vitamina E ocasiona alteraciones patológicas en el sistema inmunitario, en el tejido adiposo, muscular, nervioso y reproductor (Earle 2001). En animales de producción también se presentan numerosas patologías atribuidas al estrés oxidativo, por ejemplo la hepatitis dietética en cerdos (Gaál y col 1996), la esteatosis y miodistrofia nutricional en equinos (Araya 1997), el síndrome ascítico observado en aves de rápido crecimiento. La enfermedad de neurona motora, afección asociada a la deficiencia de vitamina E y al aumento de cobre en el tejido nervioso de equinos, también ha sido sugerida como el resultado de un daño oxidativo (Polack y col 2000). Las alteraciones más frecuentes en ganado lechero son: retención de placenta, edema de la ubre, mastitis, fiebre de leche y disminución de la inmunocompetencia (Miller y col 1993). Relacionado con la deficiencia de selenio y vitamina E se encuentra la disminución en el rendimiento reproductivo (Harrison y col 1984) y atribuido a un desbalance entre RL y AO (especialmente el selenio), se describen la enfermedad del músculo blanco (Allen y col 1975), la debilidad neonatal, la disminución de la respuesta inmune (Leyán 1997), infertilidad, abortos, quistes ováricos, metritis, degeneración testicular y desarrollo retardado (Harrison y col 1984, López Alonso y col 1997).

La fragilidad vascular, los cambios degenerativos de la hemoglobina y la fragilidad de las membranas de los eritrocitos, también corresponden a manifestaciones del desarrollo de un estrés oxidativo (Allan y col 1999).

### 3.5 EVALUACIÓN DEL DAÑO POR ESTRÉS OXIDATIVO

Para el estudio del estrés oxidativo en cuadros patológicos o para demostrar la participación de RL en modelos experimentales se han empleado diferentes técnicas analíticas, directas e indirectas.

Las técnicas directas permiten, literalmente, observar los RL, dentro de estas está la espectroscopia de quemiluminiscencia (Lunec 1996) y la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica combinada con atrapadores de spin (Rimbach y col., 1999).

Debido a la corta vida y alta reactividad, la actividad de los RL es evaluada principalmente por métodos indirectos (Cheeseman y Slater 1993, Lunec 1996).

Cabe mencionar dos técnicas indirectas, la primera es la resistencia osmótica de las membranas celulares. Esta técnica, también conocida como fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE), consiste en someter alícuotas de eritrocitos a una concentración de NaCl al 0,55%, cuantificando el grado de hemólisis como porcentaje respecto a la solución cuya concentración salina es cero (Schalm y col 1975). Esta técnica se basa en que la membrana celular del eritrocito es flexible, pero esencialmente inelástica, lo que significa que la membrana se rompe si entra agua a la célula sobre un volumen crítico, es por eso que la resistencia de los eritrocitos a la hemólisis se mide sometiéndolos a soluciones salinas de NaCl en concentraciones decrecientes (Jain 1986).

La lipoperoxidación (LPO) es el último evento que acompaña la lesión celular y no siempre es la causa del daño, pero por la facilidad con que estos productos pueden medirse, la detección de productos de la LPO para evaluar el estrés oxidativo ha centrado el mayor interés. El método más frecuente para evaluar LPO, por la simplicidad y bajo costo, es la segunda técnica en la que se realiza la estimación de malondialdehído (MDA) como sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Halliwell y Chirico 1993). El fundamento de la técnica de TBARS es hacer reaccionar la muestra a analizar con ácido tiobarbitúrico en medio ácido, adicionándole un cromógeno, que posteriormente se estima mediante absorbancia o fluorescencia. El MDA estimado proviene de la descomposición de lípidos peroxidados durante la reacción en medio ácido, principalmente, siendo su concentración proporcional a la absorbancia. Esta prueba es simple e inespecífica ya que otros aldehídos formados en la LPO también forman compuestos de la misma absorción (Chihuilaf y col 2002). Una variante en esta técnica es inducir la formación de MDA *in vitro* incubando alícuotas de eritrocitos lavados con peróxido de hidrógeno al 0.67%, después el MDA formado se determina como TBARS que se cuantifica colorimétricamente.

Considerando los antecedentes expuestos, se plantea la siguiente hipótesis: la suplementación con selenio y  $\alpha$ -tocoferol aumenta la capacidad antioxidante, disminuyendo el daño oxidativo de eritrocitos de bovinos a pastoreo de forrajes con bajo contenido de selenio.

Para aprobar o rechazar la hipótesis se hace el estudio con los siguientes objetivos:

El objetivo general es evaluar el efecto de una suplementación con selenio y  $\alpha$ -tocoferol, sobre la susceptibilidad de los eritrocitos al daño oxidativo, en bovinos mantenidos a pastoreo con forrajes de bajo contenido de selenio.

Los objetivos específicos son:

- Medir y comparar la actividad sanguínea de GSH-Px, en vaquillas a pastoreo sobre praderas con bajo contenido de selenio y vaquillas suplementadas con selenio.
- Medir y comparar la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma de vaquillas a pastoreo suplementadas con  $\alpha$ -tocoferol y vaquillas no suplementadas.
- Evaluar la correlación de la actividad de GSH-Px y la concentración de  $\alpha$ -tocoferol con la FOE y la producción de TBARS *in vitro*.

## 4. MATERIAL Y MÉTODO

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Predio

El trabajo se realizó en el Fundo Punahue, ubicado en la provincia de Valdivia, propiedad de la Universidad Austral de Chile. Este predio mantiene un rebaño bovino libre de brucelosis, tuberculosis y leucosis. Tiene antecedentes de forrajes con bajo contenido de selenio, el que es inferior a lo señalado como requerimiento mínimo para bovinos lecheros que corresponde a 0,3 ppm/ kg MS (NRC 2001).

#### 4.1.2 Animales

Se utilizaron 24 vaquillas frisón negro de 18 meses de edad, clínicamente sanas, con un peso promedio de  $267 \pm 4,04$  kg. Estas fueron manejadas exclusivamente a pastoreo sobre 5 há de praderas naturales mejoradas. Los animales se identificaron de acuerdo al autocrotal del predio y otro asignado para el estudio.

#### 4.1.3 Diseño

El trabajo se realizó durante los meses de octubre de 2004 a enero de 2005. Las 24 vaquillas se asignaron al azar a cuatro grupos experimentales cada uno. Los grupos fueron: control sin suplementación (Se- T-), suplementado con selenio (Se+T-), suplementado con  $\alpha$ -tocoferol (Se-T+) y suplementado con selenio y  $\alpha$ -tocoferol (Se+T+).

Los animales de los diferentes grupos fueron manejados como un solo grupo y permanecieron con el mismo manejo nutricional, a pastoreo, durante el período de estudio.

#### 4.1.4 Suplementación

Cada animal perteneciente a los grupos (Se+T-) y (Se+T+) se suplementó, vía subcutánea, con 1 mg Se/Kg de peso vivo, utilizando el producto comercial Deposel® (Deposel®, Young's Animal Health, New Zeland), en dosis de 1 ml/50 kg de peso vivo y a cada animal perteneciente a los grupos (Se-T+) y (Se+T+) se les inyectó  $\alpha$ -tocoferol (Vital E-300®) (Shering Plough, USA) por vía subcutánea en dosis de 500 UI/100 kg de peso vivo.

La primera suplementación con selenio se realizó el 21 de julio de 2004; en esta misma fecha se suplementó con  $\alpha$ -tocoferol y posteriormente se aplicó, igual dosis, el 16 de septiembre y el 2 de diciembre.

## **4.2 MÉTODO**

### **4.2.1 Obtención y análisis de muestras**

Al iniciar el estudio, previo a la suplementación se tomó una muestra de 10 ml de sangre heparinizada de cada animal por venopunción yugular. Posteriormente, se obtuvo en forma quincenal en octubre y noviembre y mensualmente en diciembre y enero, contabilizando un total de siete muestreos.

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria y en el Laboratorio del Instituto de Farmacología de la Universidad Austral de Chile; en el primero se midió la concentración de hemoglobina, la actividad de GSH-Px, la FOE y la lipoperoxidación de eritrocitos (TBARS), y en el segundo se midió la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol.

### **4.2.2 Método analítico**

En cada muestra se determinó la concentración de hemoglobina (expresada en g/dl) mediante el método de la cianometahemoglobina (Jain 1986).

La actividad de GSH-Px (E.C. 1.11.1.9.), expresada en U/g de hemoglobina, se analizó en un hemolizado que se preparó adicionando 20  $\mu$ l de sangre entera a 800  $\mu$ l de reactivo comercial Ransel® (Laboratorio Randox). Posteriormente, fue almacenado a  $-25^{\circ}\text{C}$  para luego ser analizado según la técnica cinética compuesta NADPH dependiente a 340 nm y  $37^{\circ}\text{C}$ , en un espectrofotómetro Hitachi 4020, utilizando un reactivo comercial.

La fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) fue medida utilizando una técnica modificada por Schalm y col (1975), que consiste en adicionar 20  $\mu$ l de sangre en 5 ml de NaCl al 0,55% y 20  $\mu$ l de sangre en agua destilada para luego medir el grado de hemólisis a 540 nm, en un espectrofotómetro Hitachi 4020.

La lipoperoxidación de eritrocitos se evaluó determinando la concentración de TBARS (ng/ml) según la metodología descrita por Duthie y col (1989) y modificada por Chihuailaf (2002). Esta consiste en oxidar la membrana celular de los eritrocitos incubándolos con peróxido de hidrógeno para que genere malondialdehído, que luego es estimado con ácido tiobarbitúrico, en un espectrofotómetro Hitachi 4020 a 535 nm; esta es expresada en unidades de densidad óptica (D.O.).

La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma se determinó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un cromatógrafo de HPLC Perkin-Elmer, acoplado a un detector UV, según la técnica propuesta por Bass y col (2000).

### **4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En el análisis estadístico se empleó el programa Graphpad Prism versión 3.0 complementado con una planilla Excel 5.0.

La normalidad de los datos se estableció mediante el test de Kolmogorov y Smirnov, los resultados se analizaron mediante el uso de estadística descriptiva, calculándose la media aritmética y la desviación estándar.

La diferencia entre y dentro de grupos se estableció mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey y las asociaciones entre las variables se establecieron mediante la prueba de correlación de Pearson. El nivel de significación empleado fue de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ACTIVIDAD SANGUÍNEA DE GSH-Px

Los valores de la actividad sanguínea de GSH-Px de los grupos suplementados con selenio (Se+T- y Se+T+) y del grupo control (Se- T-) se presentan en el cuadro 1. El periodo 0, corresponde al valor medido previo a la suplementación con selenio.

**Cuadro 1.** Actividad sanguínea de GSH-Px ( $X \pm DE$ ) en siete muestreos de vaquillas mantenidas a pastoreo, suplementadas con selenio (Se+T- y Se+T+) y control ( Se-T-).

<b>Periodo</b> (días)	<b>Suplementados</b> n = 12	<b>Control</b> n = 6
0	71,5 $\pm$ 20,3 <sup>c</sup>	81,4 $\pm$ 12,8 <sup>ab</sup>
76	122,9 $\pm$ 46,2 <sup>b</sup>	81,3 $\pm$ 11,1 <sup>ab</sup>
90	126,7 $\pm$ 37,6 <sup>b</sup>	83,7 $\pm$ 12,8 <sup>ab</sup>
104	122,6 $\pm$ 37,7 <sup>b</sup>	77,0 $\pm$ 13,6 <sup>b</sup>
118	146,0 $\pm$ 43,7 <sup>b</sup>	103,1 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>
131	151,0 $\pm$ 39,8 <sup>b</sup>	103,5 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup>
178	155,8 $\pm$ 37,9 <sup>a</sup>	103,7 $\pm$ 18,1 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	128,0 $\pm$ 28,6	92,1 $\pm$ 12,7

\* Letras distintas en la columna indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

Al inicio del estudio, ambos grupos presentan una actividad enzimática dentro de los valores considerados marginales bajos (61-101 U/g Hb) (Ceballos y Wittwer 1996).

En los grupos suplementados con selenio (Se+ T- y Se+T+) los muestreos posteriores reflejaron un aumento ( $P < 0,05$ ) de la actividad enzimática hasta alcanzar valores adecuados ( $> 130$  U/g Hb), a partir de los 118 días post suplementación.



## 5.2 CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE $\alpha$ -TOCOFEROL

En el cuadro 2 se presentan los valores de las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los grupos suplementado (Se-T+ y Se+T+) y del grupo control (Se-T-). El periodo 0, corresponde al valor medido previo a la primera suplementación con  $\alpha$ - tocoferol.

**Cuadro 2.** Concentraciones plasmáticas ( $X \pm \text{DE}$ ) de  $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en siete muestreos de vaquillas mantenidas a pastoreo, suplementadas con  $\alpha$ -tocoferol (Se-T+ y Se+T+) y control (Se-T-).

<b>Periodo</b> (días)	<b>Suplementados</b> n = 12	<b>Control</b> n = 6
0	5,7 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
76	4,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>
90	6,1 $\pm$ 0,8 <sup>ac</sup>	4,5 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>
104	5,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	4,5 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>
118	5,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	4,7 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>
131	6,2 $\pm$ 1,2 <sup>ac</sup>	5,0 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>
178	7,5 $\pm$ 1,1 <sup>bc</sup>	7,0 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	5,8 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 1,0

\* Letras distintas en la columna indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

Los promedios de las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol en el transcurso del estudio fueron de  $5,8 \pm 1$  y  $5,2 \pm 1,1$  en los grupos suplementados (Se-T+ y Se+T+) y control (Se-T-), respectivamente.

En las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol, no hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) entre los grupos, pero en ambos hubo fluctuaciones ( $P < 0,05$ ), lográndose las mayores concentraciones en el último muestreo que correspondió al periodo de verano (178 días).

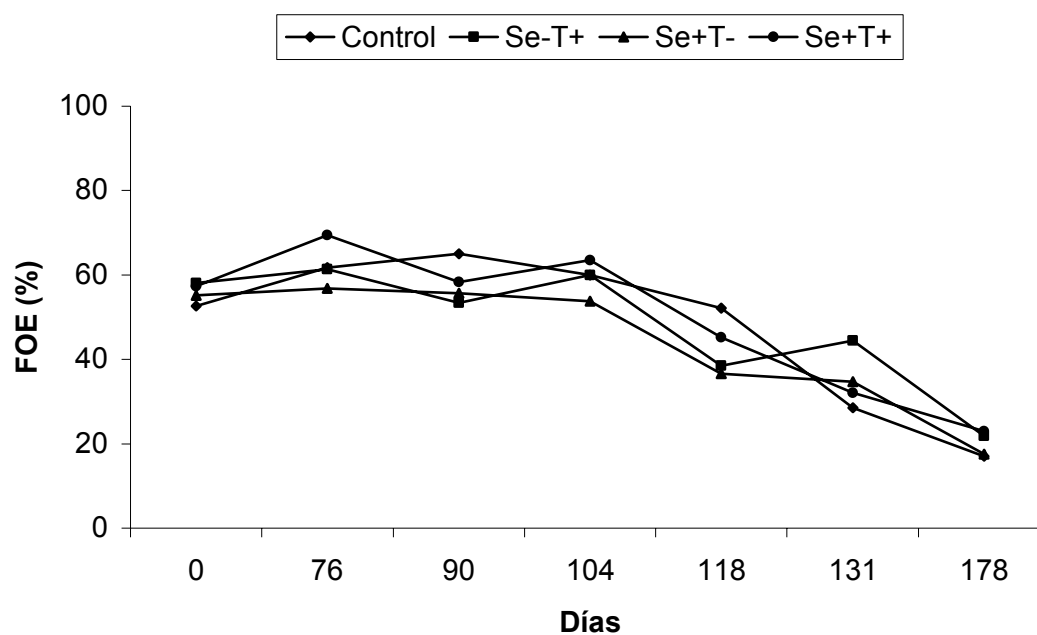
### 5.3 FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA

Los porcentajes promedio de hemólisis de los 4 grupos se presentan en el cuadro 3. Se observa una leve variación en los promedios, sin presentar diferencias ( $P>0,05$ ).

**Cuadro 3.** Porcentaje ( $X \pm DE$ ) de hemólisis de eritrocitos (FOE) a una concentración de 0,55% de NaCl, en vaquillas a pastoreo, suplementadas con selenio (Se+T-),  $\alpha$ -tocoferol (Se-T+), con ambos (Se+T+) y control (Se-T-).

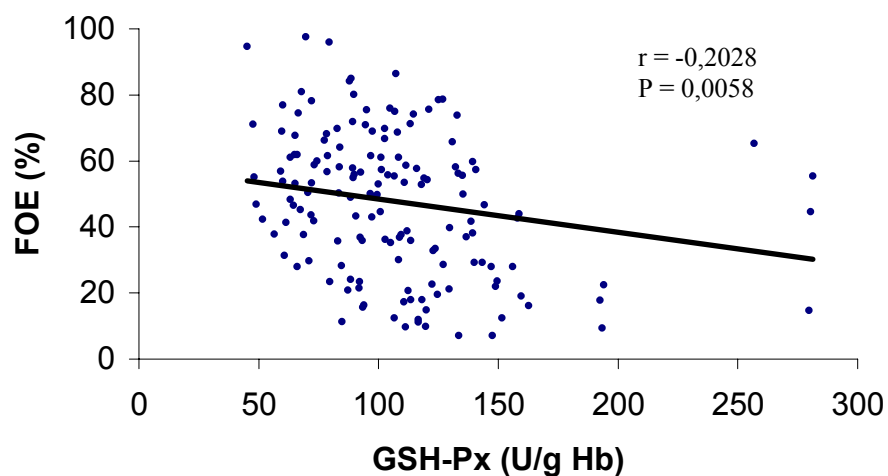
Variable	Grupos			
	Se+T-	Se- T+	Se+T+	Se- T-
FOE (%)	44,4 $\pm$ 15,1	48,2 $\pm$ 14,3	49,8 $\pm$ 17,1	48,2 $\pm$ 18,2

En la figura 1 se presentan las variaciones de los porcentajes promedio de hemólisis, observándose que los valores fueron similares entre los grupos y que hubo una disminución ( $P<0,05$ ) de la FOE en los muestreos correspondientes a finales de primavera (118 días) e inicio de verano (178 días).

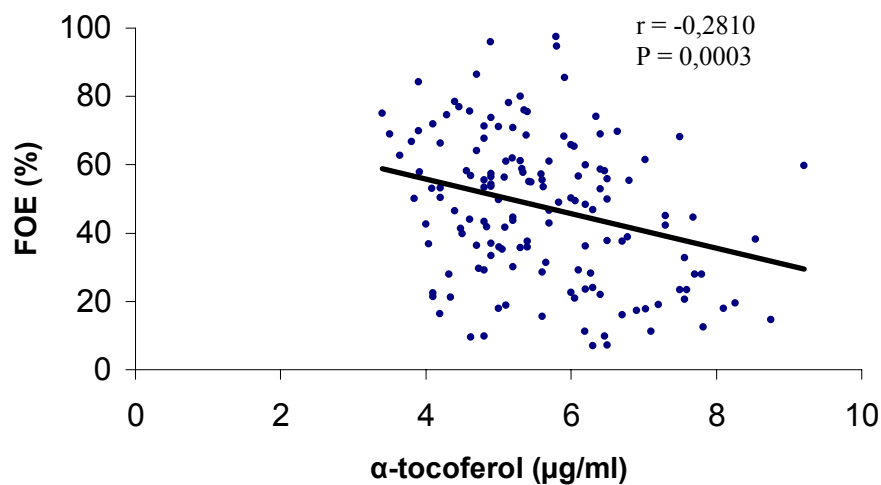


**Figura 1.** Variaciones de los porcentajes ( $X \pm DE$ ) de hemólisis de eritrocitos (FOE) a una concentración de 0,55% de NaCl, en siete muestreos de vaquillas a pastoreo, suplementadas con selenio (Se+T-),  $\alpha$ -tocoferol (Se-T+), con ambos (Se+T+) y control (Se-T-).

Las líneas de tendencia entre el porcentaje de hemólisis y la actividad sanguínea de GSH-Px y la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol se muestran en las figuras 2 y 3. Se observa que hay correlación entre variables, pero los coeficientes de correlación ( $r$ ) son bajos.



**Figura 2.** Línea de regresión entre la actividad sanguínea de GSH-Px y el porcentaje de hemólisis (FOE), en vaquillas mantenidas a pastoreo, suplementadas con selenio.



**Figura 3.** Línea de regresión entre la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol y el porcentaje de hemólisis (FOE), en vaquillas mantenidas a pastoreo suplementadas con  $\alpha$ -tocoferol.

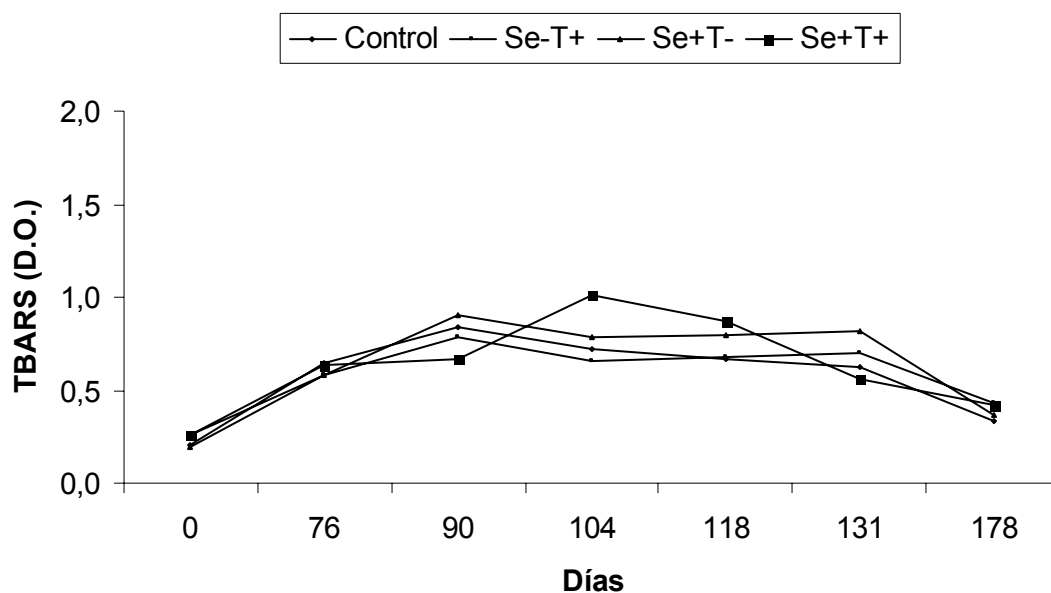
#### 5.4 LIPOPEROXIDACION DE ERITROCITOS *in vitro*

Los promedios de las concentraciones de malondialdehído medido como TBARS producidos por eritrocitos *in vitro* no difirieron ( $P > 0,05$ ) entre los grupos y se presentan en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Promedio ( $\pm$  DE) de las concentraciones *in vitro* de malondialdehído (TBARS) en eritrocitos, expresados en unidades de densidad óptica, en siete muestreos de vaquillas mantenidas a pastoreo suplementadas con selenio (Se+T-),  $\alpha$ -tocoferol (Se-T+), con ambos (Se+T+) y control (Se-T-).

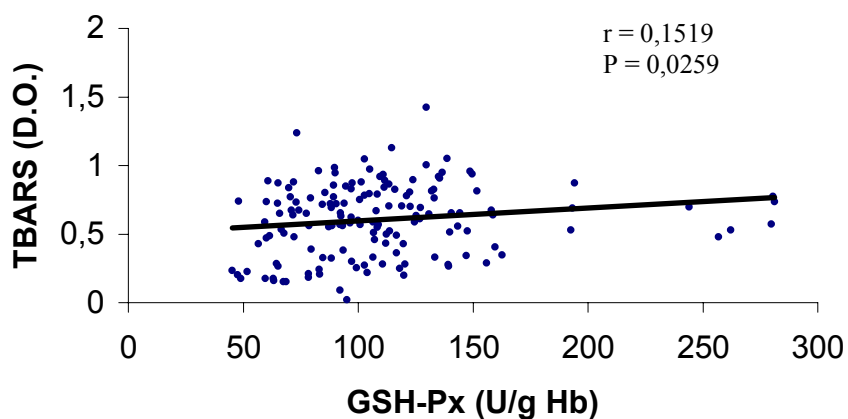
Variable	Grupos			
	Se+T-	Se- T+	Se+T+	Se- T-
TBARS (D.O.)	0,6 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2

En la figura 4 se presentan las variaciones de los promedios de TBARS, donde se observa un aumento ( $P < 0,05$ ) a partir del valor inicial hasta los 90 días, posteriormente se estabilizan hasta los 131 días y al final del periodo de estudio disminuyen, sin embargo, la producción de TBARS no evidencia diferencias ( $P > 0,05$ ) entre los grupos en estudio.

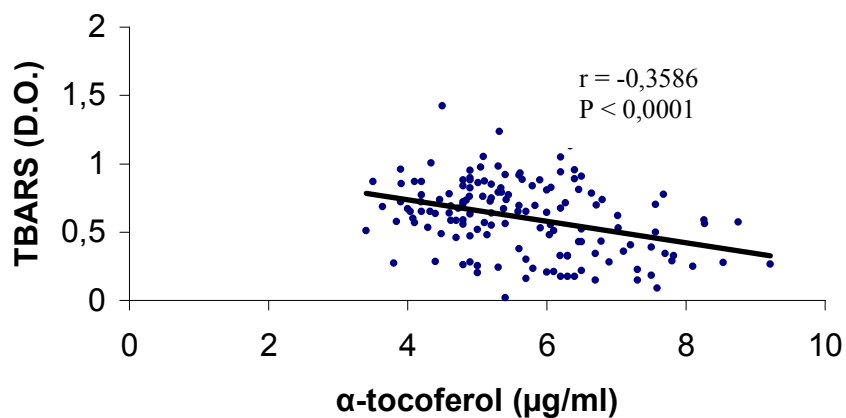


**Figura 4.** Variaciones de los promedios de las concentraciones *in vitro* de malondialdehído (TBARS) en eritrocitos, expresados en unidades de densidad óptica, en vaquillas mantenidas a pastoreo suplementadas con selenio (Se+T-),  $\alpha$ -tocoferol (Se-T+), con ambos (Se+T+) y sin suplementación (Se-T-).

Las líneas de tendencia entre la producción de TBARS y la actividad sanguínea de GSH-Px y la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol se muestran en las figuras 5 y 6. Se observa que hay asociación entre variables, pero los coeficientes de correlación ( $r$ ) son bajos.



**Figura 5.** Línea de regresión entre la actividad sanguínea de GSH-Px y la producción de TBARS, expresada en unidades de densidad óptica, en vaquillas mantenidas a pastoreo suplementadas con selenio.



**Figura 6.** Línea de regresión entre la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol y la producción de TBARS, expresada en unidades de densidad óptica, en vaquillas mantenidas a pastoreo suplementadas con  $\alpha$ -tocoferol.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 ACTIVIDAD SANGUÍNEA DE GLUTATIÓN PEROXIDASA

La actividad sanguínea de GSH-Px ( $X \pm DE$ ), previo a la suplementación con selenio, fue de  $81,4 \pm 12,8$  en el grupo control (Se-T-) y de  $71,5 \pm 20,3$  en los grupos suplementados con selenio (Se+T- y Se+T+). Estos valores son considerados marginal/bajo (61–101 U/g Hb) de acuerdo a lo señalado por Ceballos y Wittwer (1996), lo que revela que el forraje tiene un bajo contenido de selenio, situación que coincide con lo informado por otros autores (Wittwer y col 1988, Ceballos y col 1998) en el sur de Chile.

En los grupos suplementados con selenio (Se+T- y Se+T+), utilizando selenato de bario (Deposel®), se produjo un aumento sostenido y significativo ( $P < 0,05$ ) de la actividad enzimática de GSH-Px, observándose valores marginales (101–130 U/g Hb) a los 76 días posterior a la suplementación, y valores adecuados ( $> 130$  U/g Hb) desde los 118 días de iniciado el estudio. Resultados similares informaron Chihuailaf y col (2000) y Mayorga (2002), al usar el mismo procedimiento de suplementación, dosis y producto. El aumento sostenido de la actividad enzimática, posterior a la suplementación, indica que este producto es efectivo en la prevención de la deficiencia de selenio y que tiene un efecto prolongado en el tiempo, ya que se mantuvo durante el periodo de estudio.

Durante el transcurso del estudio, en el grupo control (Se-T-) se observa que la actividad de GSH-Px se mantuvo en valores similares al medido previo a la suplementación, hasta los 118 días de iniciado el estudio, donde se observa un aumento paulatino y significativo ( $P < 0,05$ ) hasta llegar al rango marginal (101 – 130 U/g Hb) (Ceballos y Wittwer 1996). Este aumento podría estar determinado por la mayor disponibilidad de forraje, ya que en primavera se produce un rápido crecimiento de los pastos, por lo tanto hay mayor consumo de nutrientes y aunque el suelo y el forraje tengan un bajo contenido de selenio, al aumentar la disponibilidad, también aumentaría la cantidad de selenio ingerido.

Si bien no hubo diferencia significativa en el promedio final de los grupos, el aumento obtenido en el grupo suplementado es biológicamente importante ya que alcanza los valores considerados adecuados (Ceballos y Wittwer 1996).

## 6.2 CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE $\alpha$ -TOCOFEROL

Los valores plasmáticos iniciales de  $\alpha$ -tocoferol en los grupos suplementados con  $\alpha$ -tocoferol (Se-T+ y Se+T+) fueron de  $5,5 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$  y  $6,1 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$  respectivamente (anexo 2) y en el grupo control (Se-T-) fue de  $5,0 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$ . El valor obtenido en el grupo control (Se-T-) es la única información en animales a pastoreo en primavera-verano en Chile, el promedio es de  $5,0 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$  y concuerda con valores entregados por la literatura (Bass y col 2000, Wichtel y col 1996).

Previo a la suplementación, la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol promedio en las vaquillas de los grupos Se-T+ y Se+T+ fue de  $5,7 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$ , luego fueron suplementadas de acuerdo a la frecuencia sugerida en otros estudios (Bass y col 2000). Las variaciones que se observan en las concentraciones plasmáticas indican que el producto, en las dosis recomendadas, aumenta las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol, pero su efecto es de corta duración (cuadro 2).

En este predio, el aporte de  $\alpha$ -tocoferol por el forraje en primavera-verano fue suficiente para suplir los requerimientos nutricionales de vitamina E de los animales en estudio (de acuerdo a los valores encontrados en la literatura, Bass y col 2000, Wichtel y col 1996), ya que como se observa en el cuadro 2 y anexo 2 las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol comienzan a aumentar en forma sostenida a partir del día 118 postsuplementación en todos los grupos, que es cuando el forraje entrega un mayor aporte de vitamina (Ballet y col., 2000). Si bien en este estudio los valores de  $\alpha$ -tocoferol fueron adecuados, sería necesario estudiar lo que ocurre con vacas en lactancia a pastoreo que tengan mayores requerimientos de  $\alpha$ -tocoferol.

Cuando se estudió la asociación entre variables se estableció que al aumentar la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol, disminuyó la FOE (cuadro 3 y figura 3) y la producción de TBARS (cuadro 4 y figura 6). Esto confirma la sugerencia que el  $\alpha$ -tocoferol sería más eficiente que GSH-Px en cuanto a la protección de las membranas al daño provocado por estrés oxidativo (Gutzwiller 1998). La importancia relativa del  $\alpha$ -tocoferol es compleja y no ha sido claramente definida; si bien es cierto que un estatus adecuado de vitamina E puede reducir los requerimientos de selenio y viceversa, ambos nutrientes no son completamente sinérgicos en la protección contra el daño de las membranas (Allison y Laven 2000).



### 6.3 FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA

Los promedios totales del porcentaje de hemólisis de eritrocitos, a una concentración de 0,55 % de NaCl, no muestran diferencias ( $P > 0,05$ ) entre los grupos, sin embargo, al observar la figura 1, el porcentaje de hemólisis disminuye (aunque no significativamente) en todos los grupos en la medida que transcurre el estudio. La disminución de la hemólisis es coincidente con el aumento de la disponibilidad de forraje y probablemente influyen cambios en la composición química que ocurren en el forraje en el periodo final de primavera y verano.

La suplementación con selenio no tuvo efecto sobre la FOE y este resultado es similar a los obtenidos por Gutzwiller (1998), quien planteo que la actividad sanguínea de GSH-Px tenía un rol secundario en la protección y estabilidad de los lípidos de membrana del eritrocito. Chuhailaf y col (2000) también obtuvo resultados similares a estos, en un estudio realizado en vacas parto e inicio de lactancia.

La suplementación con selenio y  $\alpha$ -tocoferol tampoco mostró efecto en la prueba de fragilidad osmótica eritrocitaria, sugiriendo que la suplementación conjunta de selenio y  $\alpha$ -tocoferol no tendría un efecto importante en preservar la integridad de las membranas frente al daño producido por estrés oxidativo o que la prueba de FOE no es suficientemente sensible para poner en evidencia un efecto beneficioso en la protección de las membranas de los eritrocitos.

Al aumentar la concentración de  $\alpha$ -tocoferol se observó una tendencia a disminuir la FOE (figura 3), pero el coeficiente de correlación es muy bajo (cuadro 3) para afirmar que con la suplementación se logro el efecto esperado, ya que en la figura 1 se observa que la FOE disminuyó progresivamente durante el periodo de estudio, en todos los grupos. Probablemente otros factores diferentes al selenio y al  $\alpha$ -tocoferol estarían influyendo para aumentar la resistencia a la FOE o el eritrocito no es tan sensible al daño oxidativo y por ello no sería el mejor indicador para estimar el efecto de una suplementación, con selenio, con  $\alpha$ -tocoferol o ambos, en términos de evaluar la estabilidad de membranas, situación que ha sido observada en ovinos por Ogawa y Agar (2002).

### 6.4 LIPOPEROXIDACION DE ERITROCITOS *in vitro*

Los promedios de las concentraciones séricas de TBARS fueron similares entre los distintos grupos.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo planteado por Wang y col (1996) que indican que la suplementación con selenio no disminuye la producción de TBARS, sin embargo, la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol, en este trabajo, muestra que la producción de TBARS tiende a disminuir en los dos grupos suplementados con  $\alpha$ -tocoferol (figura 5 y 6). El valor de la correlación negativa indica que la suplementación habría tenido un efecto ya que

al aumentar la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol disminuyó la producción de TBARS, pero como el coeficiente de correlación es muy bajo, no se puede afirmar que exista una asociación significativa, aunque exista la tendencia observada.

Dado que las variaciones mensuales de la concentración sérica de TBARS fueron de comportamiento similar entre grupos, durante el periodo de estudio, no se evidenció una asociación entre esta variable y la suplementación con selenio. Ello estaría reflejando la existencia de mecanismos de control de la lipoperoxidación que son independientes de la GSH-Px y del estatus de selenio.

Las observaciones registradas en este estudio están en concordancia con los planteamientos de Gutzwiller (1998), quien sostiene que el rol que desempeña GSH-Px sería secundario en la protección y estabilidad de los lípidos de membrana frente al daño por estrés oxidativo, siendo más importante el estatus de vitamina E que el de selenio. Estudios realizados en cerdos por Fontaine y Valli (1977) y Jensen y col (1983) han establecido que la producción de TBARS no se modifica en respuesta a una suplementación con selenio, pudiendo variar frente a una suplementación con vitamina E. En este estudio la vitamina E mostró tal tendencia pero no fue concluyente.

## 6.5 CONCLUSIONES

- La suplementación con selenio en dosis de 1 mg Se/kg de peso vivo en forma de selenato de bario aumentó la actividad sanguínea de GSH-Px en vaquillas mantenidas a pastoreo.
- La suplementación con  $\alpha$ -tocoferol en dosis de 500 UI/100 kg de peso vivo, aumenta las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol en vaquillas mantenidas a pastoreo, pero el efecto es de corta duración.
- Se estableció una baja correlación entre la actividad eritrocitaria de GSH-Px y la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol con la FOE y la producción de TBARS, los coeficientes de correlación también fueron bajos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Allan C, G Lacourciere, T Stadtman. 1999. Responsiveness of selenoprotein to dietary selenium. *Annu Rev Nutr* 19, 1-16.

Allen WM, R Bradley, S Barret, CK Barton, A McPhee. 1975. Degenerative myopathy with myoglobinuria in yearling cattle. *Br Vet J* 131, 292-308.

Allison R, R Laven. 2000. Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. *Vet Rec* 147, 703-708.

Araya O. 1997. Esteatosis y miodistrofia nutricional en equinos: casuística hospitalaria UACH. En: Estrés oxidativo y antioxidantes en la salud y nutrición animal. Pp 27-35. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Ballet N, J C Robert, P E V Williams. 2000. Vitamins in Forages. En: Givens D I, Owen E, Axford R F E, Omed H M (eds). Forage evaluation in ruminant nutrition. Pp 399-425.

Bandyopadhyay U, D Das, R Banerjee. 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis (Review). *Curr Sci* 77, 658-666.

Bass R, W Swecker, C Stallings. 2000. Effect of supplemental parenteral administration of vitamin E and selenium to Jerseys and Holsteins during the nonlactating period. *Am J Vet Res* 61, 1052- 1056.

Brigelius-Flohé R, M Traber. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13, 1145-1155.

Ceballos A, F Wittwer. 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch Med Vet* 28, 5-12.

Ceballos A, F Wittwer, P A Contreras, H Böhmwald. 1998. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. *Arch Med Vet* 29, 13-22.

Ceballos A, F Wittwer, P A Contreras, E Quiroz, H Böhmwald. 1999. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesq Agropec Bras* 34, 2331-2338.

Chaudière J, R Ferrari-Iliou. 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemicals mecanism. *Food Chem Toxicol* 37, 942-949.

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

Chihuailaf RH. 2002. Efecto de una ración selenio deficiente y la suplementación con selenio en la capacidad antioxidante e intensidad de daño por estrés oxidativo en bovinos. *Tesis Mg. Sci.* Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.

Chihuailaf RH, P A Contreras, J Kruze, V Leyán, R Matamoros, H Böhmwald, F Wittwer. 2000. Fragilidad osmótica eritrocitaria en vacas preparto e inicio de lactancia mantenida con ración selenio-deficiente y suplementadas con selenio. *Resúmenes del XI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria*, Santiago.

Chihuailaf RH, P A Contreras, F Wittwer. 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet Méx* 33, 265- 283.

Chow C. 1979. Nutritional influence on cellular antioxidant defence systems. *Am J Clin Nutr* 32, 1066-1081.

Dröge W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

Duthie G, J Arthur, P Bremmer, Y Kikuchi, F Nicol. 1989. Increased peroxidation of erythrocytes of stress-susceptible pigs: An improved diagnostic test for porcine stress syndrome. *Am J Vet Res* 50, 84-87.

Earle K. 2001. Nutrientes antioxidantes: Su papel en una dieta sana. *Vet Int* 13, 2-7.

Fontaine M, V Valli. 1977. Studies on vitamin E and selenium deficiency in young pigs. II. The hydrogen peroxide haemolysis test and the measure of red cell lipid peroxides as indices of vitamin E and selenium status. *Can J Comp Med* 41, 52-55.

Gaál T, B Speake, M Mézes, R Noble, P Suray, P Vajdovich. 1996. Antioxidant parameters and ageing in some animal species. *Comp Haematol Int* 6, 208-213.

Gutzwieler A. 1998. Erythrocyte resistance to oxidative damage and leucocyte capacity to reduce nitroblue tetrazolium in selenium deficient cattle. *J Vet Med A* 45, 271-278.

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

Harrison J, D Hancock, H Conrad. 1984. Vitamin E and Selenium for Reproduction of the Dairy Cow. *J Dairy Sci* 67, 123-132.

Jain N, 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*. Pp 178-207. Lea & Febiger. Philadelphia. U.S.A.

Jensen P, H Neilsen, D Danielsen, Leth T. 1983. Effect of dietary fat quality and vitamin E on the antioxidant potential of pigs. *Act Vet Scan* 24, 135-137.

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

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

Leyan V. 1997. Estrés oxidativo e inmunidad. En: Estrés oxidativo y antioxidantes en la salud y nutrición animal. Pp 11-14. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Lopez Alonso M, M Miranda, J Hernandez, C Castillo, J 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. En: *Proceedings of the VII th Congress of the International Society for Animal Clinical Biochemistry*. Pp 45. Glasgow, UK.

Machlin L, A Bendich. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1, 441-445.

Mayorga I. 2002. Variacion de las concentraciones sanguineas de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en vacas frison negro durante la lactancia mantenidas a pastoreo con forraje deficiente en selenio. *Memoria de tuilación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad austral de Chile.

Miller J, E Brzezinska-Slebozinska, F Madsen. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci* 76, 2812-2823.

National Research Council (NRC). 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. National Academic Press, Washington, D.C.. U.S.A.

Oblitas F, P A Contreras, H Böhmwald, F Wittwer. 2000. Efecto de la suplementación con selenio sobre la actividad sanguínea de glutación peroxidasa (GSH-Px) y ganancia de peso en bovinos lecheros selenio deficientes mantenidos a pastoreo. *Arch Med Vet* 32, 55-62.

Ogawa E, N Agar. 2002. Effect of oxidative agents on the erythrocyte from high GSH and low GSH sheep. *Comp Clin Pathol* 11, 93-97.

Polack E W, J M King, J F Cummings, H O Mohammed, M Birch, T Cronning. 2000. Concentration of trace minerals in the spinal cord of horses with equine motor neuron disease. *Am J Vet* 61, 609-611.

Pond W G, D C Church, K R Pond. 2002. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. Pp 179-262. Limusa. México, D. F.

Rimbach G, D Hohler, A Fischer, S Roy, F Virgili, J Pallauf, L Packer. 1999. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Anim Nutr* 52: 203-222.

Schalm, O W, N C. Jain, E J. Carroll. 1975. Veterinary Haematology. Pp 15-81 Lea & Febiger. Philadelphia. U.S.A.

Slater T. 1984. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 222, 1-15.

Wang X, P Quinn. 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Progress Lipid Res* 38, 309-336.

Wang Y, J Leibholz, W Bryden, Fraser D. 1996. Lipid peroxidation status as an index to evaluate the influence of dietary fats on vitamin E requirements of young pigs. *Br J Nutr* 75, 81-95.

Wichtel JJ, DA Freeman, AL Craigie, H Varela-Alvarez, NB Williamson. 1996. Alpha-tocopherol, selenium and polyunsaturated fatty acid concentrations in the serum and feed of spring-calving dairy heifers. *N Z Vet J* 44, 15-21.

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*. Pp 27-35. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Wittwer F, P A Contreras, H Böhmwald, R Anrique, R Fuchslocher. 1988. Concentraciones de zinc y cobre en forrajes y suero sanguíneo de 40 predios lecheros de la X Región-Chile. *Arch Med Vet* 20, 118-125.

Yu B, 1994. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74, 139-162.

## **8. ANEXOS**

**ANEXO 1.** Promedio ( $\pm$  DE) de la actividad sanguínea de GSH-Px en vaquillas mantenidas a pastoreo, suplementadas con selenio,  $\alpha$ -tocoferol, con ambos y sin suplementación.

<b>Período</b>	<b>Control</b>	<b>Se-T+</b>	<b>Se+T-</b>	<b>Se+T+</b>
<b>Días</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>
0	81,4 $\pm$ 12,8 <sup>ab</sup>	75,4 $\pm$ 29,5 <sup>ab</sup>	69,4 $\pm$ 14,3 <sup>c</sup>	73,6 $\pm$ 26,4 <sup>b</sup>
76	81,3 $\pm$ 11,2 <sup>ab</sup>	73,0 $\pm$ 17,6 <sup>ab</sup>	120,6 $\pm$ 15,3 <sup>b</sup>	125,3 $\pm$ 77,1 <sup>a</sup>
90	83,7 $\pm$ 12,8 <sup>ab</sup>	77,6 $\pm$ 15,9 <sup>ab</sup>	120,5 $\pm$ 12,8 <sup>b</sup>	132,9 $\pm$ 62,5 <sup>a</sup>
104	77,0 $\pm$ 13,8 <sup>b</sup>	68,9 $\pm$ 19,3 <sup>b</sup>	116,8 $\pm$ 12,0 <sup>b</sup>	128,6 $\pm$ 63,4 <sup>a</sup>
118	103,1 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	90,3 $\pm$ 4,9 <sup>ab</sup>	135,1 $\pm$ 17,4 <sup>ab</sup>	156,9 $\pm$ 70,1 <sup>a</sup>
131	103,5 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup>	101,8 $\pm$ 19,7 <sup>ab</sup>	143,0 $\pm$ 13,0 <sup>b</sup>	159,0 $\pm$ 66,6 <sup>a</sup>
178	103,7 $\pm$ 18,1 <sup>a</sup>	105,3 $\pm$ 21,4 <sup>a</sup>	151,0 $\pm$ 10,7 <sup>a</sup>	160,6 $\pm$ 65,3 <sup>a</sup>
<b>X Total <math>\pm</math> DE</b>	<b>90,5 <math>\pm</math> 12,2</b>	<b>84,6 <math>\pm</math> 14,6</b>	<b>122,3 <math>\pm</math> 26,6</b>	<b>133,8 <math>\pm</math> 30,6</b>

\* Letras distintas en la columna indican diferencia estadísticamente significativa (P<0,05).

**ANEXO 2.** Concentraciones plasmáticas promedios ( $\pm$  DE) de  $\alpha$ -tocoferol ( $\mu$ g/ml) en vaquillas mantenidas a pastoreo, suplementadas con selenio,  $\alpha$ -tocoferol, con ambos y sin suplementación.

<b>Período</b>	<b>Control</b>	<b>Se-T+</b>	<b>Se+T-</b>	<b>Se+T+</b>
<b>Días</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>
0	6,2 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	5,1 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	6,2 $\pm$ 0,8 <sup>ab</sup>	6,0 $\pm$ 0,6 <sup>abc</sup>
76	4,2 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	4,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	4,8 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	4,7 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>
90	4,6 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	5,7 $\pm$ 0,7 <sup>ab</sup>	5,8 $\pm$ 0,9 <sup>bc</sup>	6,5 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup>
104	4,5 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	5,1 $\pm$ 0,6 <sup>bc</sup>	5,5 $\pm$ 0,7 <sup>bc</sup>
118	4,7 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	5,0 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	5,0 $\pm$ 0,8 <sup>bc</sup>	5,1 $\pm$ 0,9 <sup>bc</sup>
131	5,0 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>	5,6 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	5,9 $\pm$ 0,7 <sup>abc</sup>	6,9 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>
178	7,1 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	7,1 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	7,0 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	7,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
<b>X Total <math>\pm</math> DE</b>	<b>5,0 <math>\pm</math> 1,0</b>	<b>5,5 <math>\pm</math> 0,9</b>	<b>5,7 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>6,1 <math>\pm</math> 1,2</b>

\* Letras distintas en la columna indican diferencia estadísticamente significativa (P<0,05).



**ANEXO 3.** Porcentaje promedio ( $\pm$  DE) de hemólisis de eritrocitos (FOE) a una concentración de 0,55% de NaCl, en vaquillas a pastoreo, suplementadas con selenio,  $\alpha$ -tocoferol, con ambos y sin suplementación.

<b>Período</b>	<b>Control</b>	<b>Se-T+</b>	<b>Se+T-</b>	<b>Se+T+</b>
<b>Días</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>
0	52,6 $\pm$ 13,7 <sup>a</sup>	58,1 $\pm$ 12,1 <sup>a</sup>	55,2 $\pm$ 13,2 <sup>a</sup>	57,3 $\pm$ 21,9 <sup>ab</sup>
76	61,8 $\pm$ 15,9 <sup>a</sup>	61,3 $\pm$ 18,1 <sup>a</sup>	56,8 $\pm$ 22,5 <sup>a</sup>	69,4 $\pm$ 17,1 <sup>a</sup>
90	65 $\pm$ 8,6 <sup>a</sup>	53,4 $\pm$ 14,2 <sup>a</sup>	55,7 $\pm$ 17,2 <sup>a</sup>	58,4 $\pm$ 15,7 <sup>ab</sup>
104	59,9 $\pm$ 7,6 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 21,3 <sup>a</sup>	53,8 $\pm$ 24,5 <sup>a</sup>	63,5 $\pm$ 23,4 <sup>a</sup>
118	52,2 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>	38,5 $\pm$ 18,8 <sup>ab</sup>	36,6 $\pm$ 22,6 <sup>ab</sup>	45,2 $\pm$ 22,9 <sup>ab</sup>
131	28,8 $\pm$ 8,7 <sup>b</sup>	44,4 $\pm$ 12,6 <sup>ab</sup>	34,8 $\pm$ 13,3 <sup>ab</sup>	32,1 $\pm$ 24,5 <sup>ab</sup>
178	17,1 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>	21,9 $\pm$ 10,9 <sup>b</sup>	17,5 $\pm$ 9,4 <sup>b</sup>	22,9 $\pm$ 18,4 <sup>b</sup>
<b>X Total <math>\pm</math> DE</b>	<b>42,2 <math>\pm</math> 18,2</b>	<b>48,2 <math>\pm</math> 14,4</b>	<b>44,4 <math>\pm</math> 15,1</b>	<b>49,8 <math>\pm</math> 17,1</b>

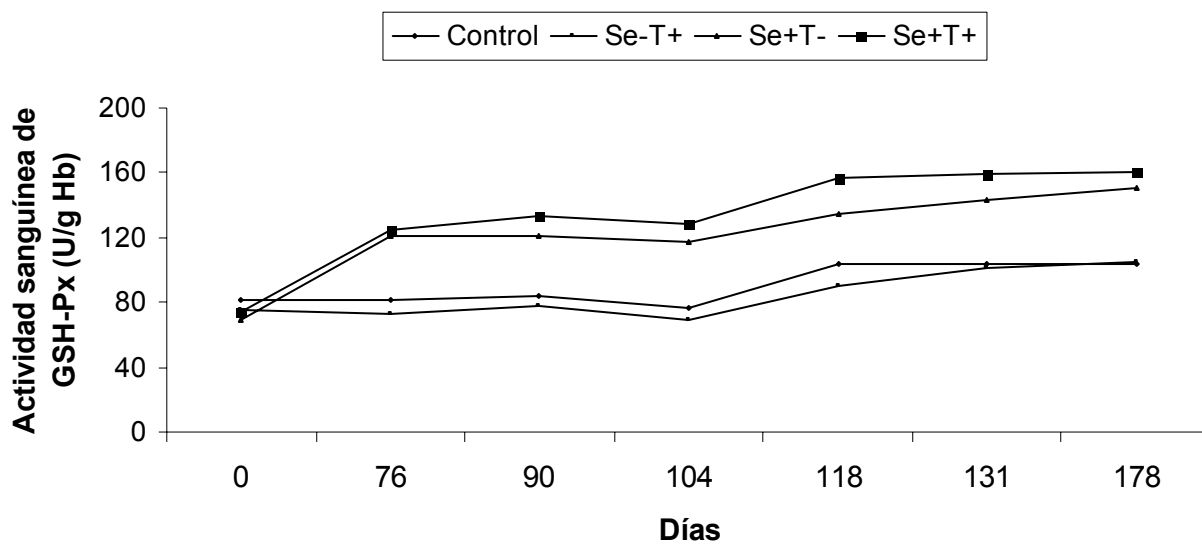
\* Letras distintas en la columna indican diferencia estadísticamente significativa (P<0,05).

**ANEXO 4.** Promedio ( $\pm$  DE) de las concentraciones *in vitro* de malondialdehído (TBARS) en eritrocitos, expresados en unidades de densidad óptica, en vaquillas mantenidas a pastoreo, suplementadas con selenio,  $\alpha$ -tocoferol, con ambos y sin suplementación.

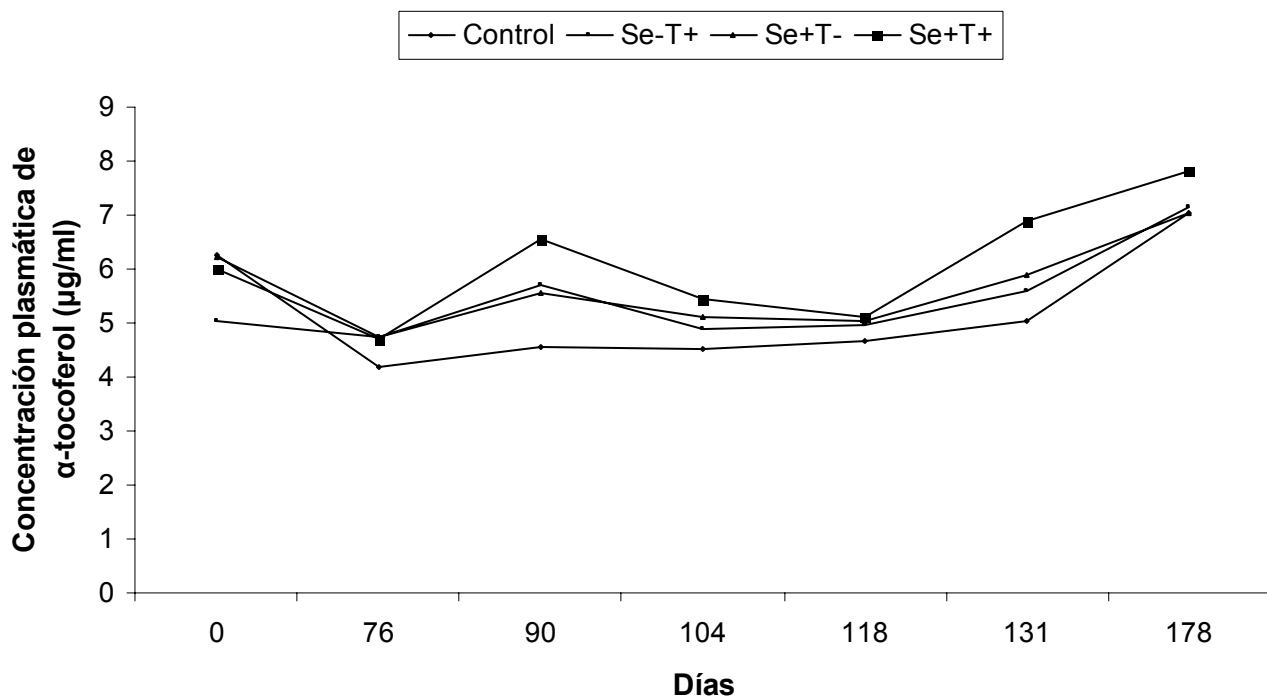
<b>Período</b>	<b>Control</b>	<b>Se-T+</b>	<b>Se+T-</b>	<b>Se+T+</b>
<b>Días</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Prom <math>\pm</math> D.E</b>
0	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,2 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
76	0,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
90	0,8 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
104	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>
118	0,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>ac</sup>
131	0,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
178	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
<b>X Total <math>\pm</math> DE</b>	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,7 <math>\pm</math> 0,2</b>

\* Letras distintas en la columna indican diferencia estadísticamente significativa (P<0,05).

**ANEXO 5.** Variaciones del promedio de la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb) en vaquillas suplementadas y no suplementadas, mantenidas a pastoreo.



**ANEXO 6.** Variación de la concentración plasmática promedio de  $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en vaquillas suplementadas y no suplementadas, mantenidas a pastoreo.



## 9. AGRADECIMIENTOS

Al término de este trabajo deseo manifestar mis más sinceros agradecimientos a todas y cada una de las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de esta Tesis:

- Dr. Pedro Contreras B., por su guía y apoyo constante, por su paciencia y sobre todo por su calidez y simpatía que hicieron que la realización de este trabajo fuera muy agradable.
- Dr. Fernando Wittwer M., por su colaboración prestada en el laboratorio, la revisión y sugerencias realizadas al presente trabajo.
- Sr. Ricardo Chihuailaf por su paciencia, guía y colaboración en todo lo que fuese necesario.
- Dr. Santiago Ernst M. por su colaboración en el análisis estadístico de los datos.
- Sra. Helga Bohmwald, por su siempre buena disposición y guía en el laboratorio.
- A Mauricio por su paciencia, cariño y apoyo incondicional.
- A mis amigos que gracias a su amistad y compañía me brindaron un gran apoyo.