

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Trabajo de Tesis realizado para optar por el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

**CONSECUENCIAS PRODUCTIVAS Y REPRODUCTIVAS DE LA DEFICIENCIA DE
SELENIO EN BOVINOS**

Autor: **LIZARRAGA**, Raúl Martín

Director: **ANCHORDOQUY**, Juan Patricio

Director: **MATTIOLI**, Guillermo Alberto

Lugares de trabajo: **Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva (FCV-
UNLP); Laboratorio de biotecnología de la reproducción IGEVET
(FCV-UNLP-CONICET).**

Miembros del jurado:

Dr. CETICA , Pablo Daniel	Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.
Dra. MADOZ , Laura Vanina	Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
Dr. PRANDO , José Alberto	Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Junio de 2021

DEDICATORIA

A mi madre (*in memoriam*),

Ya que sin su amor y paciencia yo no sería quien soy.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme una formación de excelencia y otorgarme las becas que me permitieron realizar los estudios de doctorado.

Al laboratorio de Nutrición Mineral y al Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (IGEVET), por brindarme su espacio y los recursos.

A la Chacra Experimental “Manantiales”, Chascomús, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Provincia de Buenos Aires y al Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH-CONICET-UNSAM) y particularmente al Ing. Agr. Matías Bailleres y al Dr. Rodrigo Sanabria quienes poniendo a disposición las instalaciones, los animales y el personal permitieron la realización de los experimentos.

Al Med. Vet. Checho Greco, a Tito Otondo, Juan Pablo Ferretti y a las familias Otondo y Canale, quienes nos abrieron sus tranqueras recibiéndonos de la mejor manera.

A la empresa Biogénesis Bagó, quienes aportaron las soluciones para tratar a los animales y estuvieron siempre dispuestos a sumar en este proyecto.

A Pato Anchordoquy y Coco Mattioli, quienes comenzaron como directores y terminaron siendo amigos durante este trabajo de tesis. Por su paciencia y sobre todo por sus consejos.

A Cecilia Furnus, mi directora de beca, y todo el equipo del Laboratorio de Biotecnología de la reproducción, por su compromiso, y por cada palabra alentadora durante este camino.

A los jurados de este trabajo de tesis, por su apoyo y sus consejos.

A Belu y a Esteban, con quienes a pesar de los tropiezos y caídas siempre nos enfocamos en seguir hacia adelante. Por su gran amistad.

A Ale Relling, por su ayuda desinteresada, sus consejos y su amistad.

A Diana Rosa y el equipo del Laboratorio, por su ayuda y su buena voluntad.

A Luis Fazzio y a Walter Galván y todo el equipo del servicio de Asistencia Clínica Poblacional, quienes ayudaron y siempre estuvieron disponibles para la realización de los experimentos.

A todo el equipo de la Cátedra de Fisiología y de la Cátedra de Alimentos y Nutrición Animal, con quienes compartí no solo el lugar, sino calidez humana.

A Eli, Mate, Nico, Mauri, Joaco, Rami y Luis, por su ayuda, apoyo y sobre todo por la amistad.

A mis hermanos, por todo.

Y finalmente a Dolo, quien estuvo codo a codo durante este trabajo de tesis, por su apoyo, por su amor, por aguantar mis horarios y mis horas de computadora.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

- Lizarraga, RM; Galarza, EM.; Rosa, DE; Fazzio, LE; Rojas, G; Mattioli, GA., Efecto de suplementación inyectable con selenio en terneros al pie de la madre, 2017, VI Congreso Argentino de Nutrición Animal, 28 y 29 de junio de 2017 en Buenos Aires, Argentina. Presentación oral.
- Lizarraga RM; Galarza EM; Anchordoquy JP; Rosa DE; Mattioli GA. Efecto de la suplementación inyectable con selenio sobre la actividad de glutatión peroxidasa y el peso en terneros al pie de la madre. Argentina, XXII Reunión Científico Técnica Dr. Bernardo Jorge Carrillo. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnostico, 14 al 17 de noviembre 2018, Córdoba, Argentina.
- Lizarraga RM; Galarza E; Anchordoquy JM; Farnetano NA; Furnus CC; Anchordoquy JP. Efecto de la suplementación con selenio al medio de maduración in vitro sobre la capacidad antioxidante y los niveles de lipoperoxidación del complejo ovocito cúmulus bovino. 4to Congreso Internacional de Tecnologías Embrionarias, SATE, 27 y 28 de septiembre 2018, Tandil, Argentina.
- Lizarraga RM, Anchordoquy JM, Galarza EM, Farnetano NA, Carranza-Martin A, Furnus CC, Mattioli GA, Anchordoquy JP. Sodium Selenite Improves In Vitro Maturation of Bos primigenius taurus Oocytes. Biol Trace Elem Res. 2019. Doi: 10.1007/s12011-019-01966-2.
- Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Lizarraga RM, Nikoloff N, Pascua AM, Furnus CC. The importance of trace minerals copper, manganese, selenium and zinc in bovine sperm-zona pellucida binding. Zygote. 2019 Apr;27(2):89-96. doi: 10.1017/S0967199419000078.
- Lizarraga RM. Capítulo 8: Selenio. Mattioli GA editor. Nutrición Mineral y Vitamínica de Bovinos. 2da Edición. La Plata: CCB academic press; 2019. ISBN: 978-987-86-0756-6. pp. 167-184

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE TABLAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
RESUMEN.....	XV
SUMMARY	XVII
CAPÍTULOS.....	1
CAPÍTULO I.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	2
EL SELENIO.....	2
Funciones biológicas (selenoproteínas)	7
Glutación peroxidasas	8
Tioredoxin reductasas	9
Desiodinasas.....	10
Selenoproteína P.....	10
Selenofosfato sintetasa	11
Diagnóstico de la deficiencia de Se en bovinos.....	11
LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RÍO SALADO Y EL RIESGO DE CARENCIA DE SELENIO.....	13
BIBLIOGRAFÍA	16
CAPÍTULO II	28
RELEVAMIENTO DEL ESTATUS DE SELENIO EN RODEOS BOVINOS DE LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RIO SALADO.....	28
INTRODUCCIÓN.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Animales y establecimientos	31

Relevamiento del estatus de Se a través de la actividad GPx en rodeos bovinos de la CDS.....	31
Asociación entre la actividad GPx en bovinos y la estación del año.....	32
Recolección de sangre y determinaciones de hematocrito y actividad GPx.....	33
Diseño experimental	34
Relevamiento del estatus de Se a través de la actividad GPx en rodeos bovinos de la CDS	34
Asociación entre la actividad GPx en bovinos y la estación del año	35
Análisis estadístico.....	35
RESULTADOS	36
Relevamiento del estatus de Se en rodeos bovinos de la CDS	36
Asociación entre la actividad GPx en bovinos y la estación del año.....	39
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA	46
CAPÍTULO III	51
EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PARENTERAL CON SELENIO SOBRE LA GANANCIA DE PESO Y LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA EN TERNEROS EN PREDESTETE Y EN UN SISTEMA DE CONFINAMIENTO.	51
INTRODUCCIÓN.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
Animales, establecimientos y sistemas productivos.....	54
Evaluación de la suplementación con Se en un sistema de cría	54
Evaluación de la suplementación con Se en un sistema de engorde en confinamiento	55
Recolección de sangre y determinaciones de hematocrito y actividad GPx.....	57
Diseño experimental	58
Efecto de la suplementación parenteral con Se en terneros en un sistema de cría..	58
Efecto de la suplementación parenteral con Se en terneros en un sistema de confinamiento.....	58
Análisis estadístico.....	59
RESULTADOS	59
Efecto de la suplementación con Se en terneros en un sistema de cría	59
Efecto de la suplementación con Se en terneros en un sistema de engorde en confinamiento	61
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA	68

CAPÍTULO IV	77
EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SELENIO SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ EN VACAS INSEMINADAS A TIEMPO FIJO Y LA CALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS CULTIVADOS IN VITRO	77
INTRODUCCIÓN.....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
Ensayos in vivo	80
Animales y protocolo de IATF	80
Recolección de sangre y determinaciones de hematocrito y actividad GPx.....	81
Ensayos in vitro.....	82
Reactivos y medios	82
Preparación del semen	83
Evaluación de la integridad estructural (viabilidad) y funcional de las membranas plasmáticas.....	84
Evaluación del estatus acrosomal	86
Ensayo de unión de espermatozoides a la zona pelúcida.....	87
Evaluación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	89
Evaluación del estatus antioxidante total.....	89
Diseño experimental	90
Efecto de la suplementación inyectable con Se al inicio de un protocolo de IATF sobre el porcentaje de preñez de hembras bovinas	90
Efecto del Se sobre la integridad estructural de la membrana plasmática (viabilidad)	90
Efecto del Se sobre la integridad funcional de la membrana plasmática.....	91
Efecto del Se sobre el estatus acrosomal.....	91
Efecto del Se sobre la capacidad de unión de espermatozoides a la zona pelúcida	91
Efecto del Se sobre los niveles de peroxidación lipídica	92
Efecto del Se sobre el estatus antioxidante total	92
Análisis estadístico.....	93
RESULTADOS	93
Efecto de la suplementación parenteral con Se al inicio de un protocolo de IATF sobre el porcentaje de preñez de hembras bovinas	93
Efecto del Se sobre la integridad estructural de la membrana plasmática (viabilidad)	94
Efecto del Se sobre la integridad funcional de la membrana plasmática.....	95
Efecto del Se sobre el estatus acrosomal	96
Efecto del Se sobre la capacidad de unión de espermatozoides a la zona pelúcida....	96
Efecto del Se sobre los niveles de peroxidación lipídica.....	98

Efecto del Se sobre el estatus antioxidante total	99
DISCUSIÓN	100
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	105
CAPÍTULO V	115
EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SELENIO SOBRE LA MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS Y SU CAPACIDAD DE DESARROLLO POSTERIOR	115
INTRODUCCIÓN	115
MATERIALES Y MÉTODOS	117
Reactivos y medios	117
Maduración, fertilización y cultivo <i>in vitro</i>	118
Análisis de la maduración nuclear de ovocitos	120
Evaluación de la viabilidad de las células del cúmulus	121
Evaluación de la apoptosis en las células del cúmulus mediante el ensayo de tinción con Anexina V	121
Ensayo de glutatión total	122
Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	123
Ensayo de estatus antioxidante total	123
Determinación de la concentración de Selenio en licor folicular y en el medio de maduración	124
Diseño experimental	124
Efecto del Se sobre la viabilidad de las células de cúmulus	124
Efecto del Se sobre la apoptosis	125
Efecto del Se sobre la concentración total de glutatión	125
Efecto del Se sobre la peroxidación lipídica	125
Efecto del Se sobre el estatus antioxidante total	126
Efecto del Se sobre la maduración nuclear de ovocitos	126
Efecto del Se sobre el desarrollo embrionario posterior	126
Análisis estadístico	126
RESULTADOS	127
Determinación de la concentración de Se en el licor folicular y medio de maduración	127
Efecto del Se sobre la viabilidad	127
Efecto del Se sobre la apoptosis	127
Efecto del Se sobre la concentración total de glutatión	128
Efecto del Se sobre la peroxidación lipídica	129

Efecto del Se sobre el Estatus antioxidante total	130
Efecto del Se sobre la maduración nuclear de ovocitos.....	131
Efecto del Se sobre el desarrollo embrionario posterior	132
DISCUSIÓN	133
CONCLUSIONES.....	136
BIBLIOGRAFÍA	138
CAPÍTULO VI.....	146
CONCLUSIONES GENERALES	146

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/L: Microgramos/ litro	MS: Materia seca
CC: Células del cúmulus	ng/ml: Nanogramo/mililitro
CDS: Cuenca deprimida del Río Salado	P4: Progesterona
CIV: Cultivo de embriones in vitro	PGF: Prostaglandina
COC: Complejo ovocito-cúmulus	pH: Potencial de Hidrogeniones
D: Iodotironina desiodinasa	Ppm: Partes por millón
DIB: Dispositivo intravaginal bovino	EROs: Especies reactivas del oxígeno
EA: Estatus acrosomal	S: Azufre
EAT: Estatus antioxidante total	SC: Subcutánea
EB: Benzoato de estradiol	Se: Selenio
EMB: Enfermedad de músculo blanco	Se0: Selenio elemental
FIV: Fertilización in vitro	Se-2: Seleniuro
FO: Fluido oviductal	Se-Cys: Selenocisteína
g/d: Gramos por día	Se-Met: Selenometionina
GDP: Ganancia diaria de peso	SeO3: Selenito
GPx: Glutación peroxidasa	SeO4: Selenato
GR: Glutación Reductasa	SepP: Selenoproteína P
GSH: Glutación oxidado	SFB: Suero fetal bovino
GSSG: Glutación reducido	SPS: Selenofosfato sintetasa
Hto: Hematocrito	T3: 3,3',5-triyodotironina
IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo	T4: Tetrayodotironina
Ig: Inmunoglobulinas	TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
IM: Intramuscular	TrxR: Tioredoxin reductasa
MDA: Malondialdehido	UI: Unidades Internacionales
mg/kg: Miligramo/ kilogramo	Vit E: Vitamina E
MIV: Maduración in vitro	ZP: Zona pelúcida
Mmol/litro: Milimol/litro	

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Actividad GPx en sangre entera según la categoría animal y el partido de la CDS.	37
Tabla 2.2. Actividad GPx en sangre entera según la estación del año, la categoría animal y el establecimiento dentro del partido de Chascomús.	40
Tabla 3.1. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre el peso vivo y la GDP en terneros de cría al pie de la madre.	60
Tabla 3.2. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre el peso vivo y la GDP en terneros durante el período de adaptación.	62
Tabla 4.1. Integridad estructural (viabilidad) y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos luego de la incubación por 0, 3 y 6 h en medio FIV suplementado con Se.	95
Tabla 4.2. Integridad de acrosomas en espermatozoides bovinos luego de la incubación por 0, 3 y 6 h en medio FIV suplementado con Se.	96
Tabla 5.1. Apoptosis en células del cúmulus maduras <i>in vitro</i> con distintas concentraciones de Selenio.	128
Tabla 5.2. Concentración intracelular total de glutatión en ovocitos y células del cúmulus bovinos madurados con distintas concentraciones de Selenio.	129
Tabla 5.3. Maduración nuclear de ovocitos bovinos madurados con diferentes concentraciones de Selenio.....	132
Tabla 5.4. Capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos madurados con diferentes concentraciones de Selenio.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Ubicación geográfica de la Cuenca Deprimida del Río Salado y de los partidos muestreados.	32
Figura 2.2. Ubicación geográfica de los establecimientos en estudio dentro del partido de Chascomús.....	33
Figura 2.3. Actividad GPx en vacas y terneros de diferentes partidos de la CDS.	38
Figura 2.4. Distribución porcentual de los animales según su estatus de Se en los diferentes partidos de la CDS.....	39
Figura 2.5. Actividad GPx en vacas y terneros de diferentes establecimientos del partido de Chascomús.....	41
Figura 2.6. Distribución porcentual del estatus de Se por rangos, en vacas y terneros del partido de Chascomús según la estación del año.....	42
Figura 3.1. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre la actividad GPx en sangre entera en terneros de cría al pie de la madre.....	61
Figura 3.2. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre la actividad GPx en sangre entera en terneros durante el período de adaptación al confinamiento.....	63
Figura 4.1. Espermatozoides observados en microscopio óptico, evaluados mediante la tinción de eosina-nigrosina (A) y la prueba de hinchazón hipoosmótica (HOST) (B).	86
Figura 4.2. Estatus Acrosomal de espermatozoides bovinos utilizando una aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada con isotiocianato de fluoresceína.....	87
Figura 4.3. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre la actividad de GPx en sangre entera en vacas suplementadas al inicio del protocolo de IATF (Campo “B”).	94

Figura 4.4. Espermatozoides unidos a la ZP luego de la incubación con diferentes concentraciones de Se.....	97
Figura 4.5. Espermatozoides bajo microscopio de epifluorescencia unidos a la ZP luego de la incubación con diferentes concentraciones de Se.....	98
Figura 4.3. Efecto de la suplementación con Se sobre la concentración de MDA luego de 2 h de incubación.....	99
Figura 4.4. Efecto de la suplementación con Se sobre el EAT luego de 2 h de incubación.	100
Figura 5.1. Embriones cultivados in vitro en diferentes estadios morfológicos del desarrollo.	120
Figura 5.2. Peroxidación lipídica en los complejos ovocitos-cúmulus madurados con diferentes concentraciones de Selenio.....	130
Figura 5.3. Estatus antioxidante total en complejos ovocito-cúmulus madurados con distintas concentraciones de Selenio.....	131

CONSECUENCIAS PRODUCTIVAS Y REPRODUCTIVAS DE LA DEFICIENCIA DE SELENIO EN BOVINOS

Palabras clave: selenio, antioxidante, lipoperoxidación, relevamiento, glutatión peroxidasa, bovinos de carne, inseminación artificial, calidad espermática, maduración *in vitro*, desarrollo embrionario.

RESUMEN

El presente trabajo de tesis consistió en evaluar la prevalencia de la deficiencia de Selenio (Se) en rodeos de cría bovina de la Cuenca Deprimida del Río Salado (CDS) y estudiar sus consecuencias productivas y reproductivas. Para tal fin se plantearon los siguientes objetivos particulares: a) evaluar el estatus de Se en rodeos bovinos de la CDS; b) estudiar el efecto de la suplementación parenteral con Se sobre la ganancia de peso y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en terneros en el período predestete y en adaptación al engorde; c) estudiar el efecto de la suplementación con Se sobre el porcentaje de preñez en vacas inseminadas a tiempo fijo (IATF) y sobre la calidad de los espermatozoides bovinos cultivados *in vitro*; y d) establecer el efecto de distintas concentraciones de Se sobre la maduración de ovocitos bovinos y su capacidad de desarrollo posterior. Los resultados obtenidos demostraron que la prevalencia de la carencia de Se en la CDS ronda el 50 % y no esta asociada a la estación del año, presentando los animales jóvenes un mayor riesgo de sufrir la carencia. Por otro lado, se observó que la suplementación con Se en forma parenteral aumentó la ganancia de peso en los terneros, el porcentaje de preñez en las hembras sometidas a un protocolo de IATF y la actividad GPx en sangre en ambas categorías (ensayos

in vivo). Los resultados obtenidos *in vitro* establecieron que, la suplementación con Se al medio de fecundación *in vitro* (FIV) mejora la calidad de los espermatozoides bovinos, aumentando la viabilidad, la integridad de la membrana plasmática, el estatus acrosomal (EA) y el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida; mientras que, la suplementación durante la maduración *in vitro* (MIV) aumentó la viabilidad de las células del cúmulus (CC), el contenido intracelular de glutatión total en las CC y ovocitos, disminuyó los niveles de lipoperoxidación en los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) e incrementó la tasa de eclosión de los embriones. En conjunto, la evidencia obtenida demuestra que los bovinos de la CDS sufren deficiencia de Se, con un mayor riesgo para los animales jóvenes y que la suplementación con Se previene las pérdidas subclínicas productivas y reproductivas demostradas en los ensayos *in vivo*. Estos resultados sumados a los obtenidos *in vitro*, sugieren que el Se podría actuar como un factor importante en la calidad de los espermatozoides y en la maduración del COC en bovinos.

EFFECT OF SELENIUM DEFICIENCY ON BOVINE PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE

Key words: selenium, antioxidant, lipid peroxidation, survey, glutathione peroxidase enzyme, beef cattle, fixed-time artificial insemination, sperm quality, *in vitro* maturation, embryo development.

SUMMARY

The present thesis dissertation has focused on the evaluation of the prevalence of selenium (Se) deficiency in cattle breeding herds of the Salado River basin (SRB), Buenos Aires, and its effect on productive and reproductive performance. For that purpose, the following specific objectives were proposed: a) evaluate Se status in SRB bovine herds, b) study the effect of Se parenteral supplementation on weight gain and glutathione peroxidase enzyme (GPx) activity of calves during the pre-weaning and adaptation to fattening periods; c) study the effect of Se supplementation on pregnancy rates of cows subjected to a fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol and on the *in vitro* quality of cultured bovine sperm, and d) establish the effect of different Se concentrations on the maturation and development capacity of bovine oocytes. The results showed that Se deficiency in the SRB was around 50%, was not associated with seasonal variations and had a greater impact on young animals. On the other hand, whereas parenteral Se supplementation increased calf weight gain, pregnancy rate in females subjected to the FTAI protocol and blood GPx activity in both categories (*in vivo* trials), Se supplementation to *in vitro* fertilization medium improved bovine sperm quality, increasing sperm viability, plasma membrane integrity, acrosomal

status and number of sperm bound to the zona pellucida. During *in vitro* maturation, Se supplementation increased cumulus cell (CC) viability, total intracellular glutathione content in both CCs and oocytes, decreased lipid peroxidation levels in cumulus-oocyte complexes (COCs) and increased the hatching rate of embryos. Altogether, the evidence obtained shows that SRB cattle were Se deficient, young animals had an increased risk for such deficiency and that Se supplementation prevented subclinical productive and reproductive losses, as demonstrated by *in vivo* tests. This, together with *in vitro* results, suggest that Se could act as an important factor for sperm quality and the maturation process of COC in bovines.

CAPÍTULOS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

EL SELENIO

El Selenio (Se) es un elemento ligado a la salud y a la producción, que comenzó siendo estudiado por su toxicidad (Painter, 1941), y no fue hasta 1957 que fue considerado como un mineral esencial, cuando se demostró que participaba como un componente del “factor 3” en la prevención de la degeneración hepática en ratas (Schwarz y Foltz, 1957). Poco después, también se demostró que prevenía la llamada enfermedad de músculo blanco (EMB), forma clínica de la deficiencia en rumiantes (Muth y col., 1958; Hogue, 1958), y fue vinculado junto con la vitamina E en la prevención de diferentes síndromes productivos y reproductivos en rumiantes (Underwood, 1971; Jenkins y Hidiriglou, 1972; Frost, 1973). Las distintas manifestaciones de la deficiencia de este elemento sugieren la participación del Se en diversos mecanismos. La prevención de la lipoperoxidación a nivel de las membranas celulares, la modulación del sistema inmune, así como su rol dentro del metabolismo de las hormonas tiroideas, serían algunos de los mecanismos principales a través de los cuales el Se mejoraría la salud y la producción de los bovinos (Ammerman y Miller, 1975; Arthur y col., 1992; Wichtel, 1998; Arthur y col., 2003; Spears y Weiss, 2008).

El suelo es la principal fuente de Se para el forraje y los granos que consumen los animales. En este sentido, ciertos lugares se caracterizan por el escaso contenido de Se en el suelo, mientras que otros poseen exceso de este mineral, siendo la concentración promedio a nivel mundial de 0,4 ppm (Reilly, 1996; Fordyce, 2007; Gupta y Gupta, 2017). Si bien la

concentración de Se en el suelo es un factor importante, la cantidad de Se en los vegetales dependerá, principalmente, de su capacidad de tomar el elemento. Es así como podemos encontrar alimentos deficientes, con apenas 0,01 ppm, a alimentos con riesgo de toxicidad, con más de 5 ppm de Se (McDowell, 1992). El contenido de Se de las plantas está condicionado por la biodisponibilidad del elemento en el suelo, la cual depende directamente de las características de este último, dentro de las cuales se encuentra el pH, el potencial redox, el contenido de materia orgánica y la actividad microbiana, y por variables ambientales como las precipitaciones (Sharma y col., 2015; Jones y col., 2017; Li y col., 2017). La forma química en la que se encuentre el Se es el principal factor que determina la absorción del mineral por parte de las plantas (Jones y col., 2017). Los selenatos (SeO_4) son la forma en que predomina en suelos agrícolas, seguida por los selenitos (SeO_3), con una menor solubilidad en agua, y por último los seleniuros (Se^{-2}) y el Se elemental (Se^0), no disponible para los forrajes (Alloway, 2013). En suelos alcalinos, oxigenados y con un potencial redox elevado, predominan los selenatos, mientras que en suelos ácidos, poco oxigenados, con tendencia al anegamiento y de menor potencial redox predominan los selenitos y las formas insolubles de menor biodisponibilidad (Alloway, 2013; Sharma y col., 2015). Utilizando la concentración de Se en granos como indicador de biodisponibilidad, Lyons y col. (2004) encontraron mayor concentración del mineral en los granos que crecieron en suelos más alcalinos (pH 8,6) comparado con aquellos de suelos más ácidos (pH 6,6). En este mismo sentido, la biodisponibilidad del Se se relaciona en forma negativa con la cantidad de materia orgánica. Al incrementarse la actividad microbiana aumentaría la reducción del Se a las formas insolubles y la incorporación y fijación del elemento en la biomasa (Li y col., 2017). Un claro ejemplo de la importancia de la biodisponibilidad del Se en el suelo es la carencia del elemento en las personas de la provincia de Hebei, China, donde

si bien los suelos poseen baja concentración de Se (0,15 ppm en promedio), la enfermedad de Keshan se manifiesta asociada a la ausencia del elemento en la dieta (Johnson y col., 2000). Estos autores demostraron que la prevalencia de esta enfermedad no está correlacionada con el contenido de Se en el suelo donde se cultivan los alimentos, sino con la baja biodisponibilidad del elemento, debido a la elevada proporción de materia orgánica, a los procesos de reducción del Se hacia las formas insolubles y la adsorción con hidróxidos de hierro y aluminio que limitan la biodisponibilidad del Se en el suelo.

El Se ingresa a la planta a través de transportadores ubicados en la membrana celular de las raíces. El selenito es captado mediante el sistema de captación de fosfatos y también por difusión simple, mientras que el selenato ingresa por medio del sistema de transportadores de alta afinidad que captan los sulfatos (Ellis y Salt, 2003; Li y col., 2008). Esto explica por qué elevadas concentraciones de sulfatos y fosfatos en los suelos conlleven a una menor concentración de Se en los forrajes (White y col., 2004; Li y col., 2008). Dada la similitud del Se con el azufre (S), ambos elementos compiten tanto en su absorción como en su movilización dentro de la planta, y luego de una reducción tanto del selenito como del selenato a seleniuro, son metabolizados mediante las vías de asimilación del S (Gupta y Gupta, 2017). De esta manera, reemplazando el S dentro de la estructura de aminoácidos por Se, se producen los aminoácidos selenometionina (Se-Met) y selenocisteína (Se-Cys), siendo la primera la forma más frecuente de encontrar el Se en forrajes y granos (Sors y col., 2005). Por lo tanto, los forrajes y granos utilizados para alimentar a los animales aportarán Se-Met, Se-Cys, selenatos y selenitos, y una serie de metabolitos intermedios.

El Se también puede ser aportado a la dieta mediante suplementos vitamínicos minerales, en los cuales el mineral se halla generalmente en forma de sales de selenitos y selenatos, así como también en forma de selenolevaduras, que es una presentación comercial

que aporta el Se principalmente como Se-Met y pequeñas cantidades de Se-Cys (Schrauzer, 2000; Weiss, 2005).

La absorción del Se en los rumiantes es menor que en animales no rumiantes, debido a que el ambiente ruminal genera cambios sobre todas las formas de Se, condicionando su absorción en el intestino delgado (Ceballos y Wittwer, 1996). La proteólisis bacteriana ruminal, a la cual son sometidas las proteínas que llegan al rumen, resulta en la liberación de Se-Met y Se-Cys, con su posible reutilización en la síntesis de proteína microbiana, o en la degradación final de los aminoácidos con la liberación de Se al medio ruminal (Aspila, 1991; Van Ryssen y Schroeder, 2003). Una porción de los selenatos es reducida a selenitos, debido al ambiente reductor y las bacterias ruminales, mientras que otra fracción abandona sin cambios el rumen hacia el intestino. Por otro lado, el selenito de la dieta, o el producido por reducción de los selenatos, puede ser reducido nuevamente y convertido a seleniuro y selenio elemental, no disponible para su absorción a nivel intestinal (Van Saun, 1990; Turner y col., 1998). Cierta cantidad de selenito es utilizado para la síntesis de selenoaminoácidos por parte de los microorganismos ruminales, e incorporado en sus propias proteínas (Hidiroglou y col., 1968). En este sentido, los microorganismos ruminales son capaces de incorporar Se tanto desde fuentes inorgánicas como a partir de los selenoaminoácidos para la síntesis de sus propias proteínas (Koenig y col., 1997; Galbraith y col., 2015). Entre un 40% a 60% del selenito abandona el rumen hacia el intestino donde es absorbido a través de mecanismos de difusión pasiva (Serra y col., 1994), mientras que los selenatos serían absorbidos por un transporte activo con gasto de energía compartido con el S (Fairweather-Tait, 1997). Por su parte, los selenoaminoácidos que llegan desde el rumen, o aquellos que quedan disponibles luego de la lisis bacteriana a nivel abomasal, son absorbidos en el

intestino delgado, por los mismos mecanismos que son absorbidos los respectivos aminoácidos azufrados (Weiss, 2005).

A nivel de los enterocitos, una porción de las fuentes de Se, y principalmente las inorgánicas, pueden ser reducidas a seleniuro y utilizadas para la síntesis de selenoproteínas, o volcadas a la sangre donde serán reducidas por los eritrocitos a expensas de glutatión, para ser unidos a albúmina y globulinas y transportarse hacia el hígado (Gasiewicz y Smith, 1978; Aspila, 1991; Santhosh Kumar y Priyadarsini, 2014). Los selenoaminoácidos, absorbidos mediante la vía de absorción de los aminoácidos, son también transportados hacia el hígado (Cousins, 2012).

En cuanto a la Se-Met, una vez absorbida, ingresa al pool de metionina quedando disponible para ser introducida en las proteínas corporales, sin diferenciarse el aminoácido azufrado de la Se-Met. De esta manera, la Se-Met dentro de las proteínas serviría como un pool de reserva de Se a largo plazo, aunque sin regulación y solamente disponible a partir de la degradación y regeneración proteica y la transulfuración del aminoácido hacia Se-Cys o su lisis con la consecuente formación de metilselenol (Schroeder y Mitchener, 1972).

El hígado tiene un rol central en el metabolismo del Se en el organismo. Las fuentes inorgánicas y la Se-Cys serán reducidas y formarán parte del pool de seleniuro disponible, el cual es utilizado para la síntesis de las selenoproteínas hepáticas y de selenoproteína P (SepP; Davidson y Kennedy, 1993). La SepP es secretada al plasma conteniendo 10 Se-Cys en su estructura y actúa como proteína transportadora de Se en el organismo (Preedy, 2015). Si bien la SepP tendría una afinidad por las membranas celulares, receptores específicos en los diferentes tejidos captan la SepP por endocitosis, para ser reutilizado el Se en la síntesis de las diferentes selenoproteínas (Wilson y Tappel, 1993; Burk y Hill, 2015).

Las madres transfieren Se a sus crías por vía placentaria y también por calostro y leche luego del nacimiento (Mehdi y Dufrasne, 2016). Durante el último tercio de gestación se produce una movilización de Se hacia el hígado fetal y la ubre con el fin de suplir los requerimientos del feto y la posterior secreción de calostro (Van Saun y col., 1989; House y Bell, 1994). En este sentido, las formas orgánicas de Se serían más eficientes en atravesar la placenta en comparación con las formas inorgánicas (Levander, 1986), de la misma manera que la Se-Met es incorporada rápidamente dentro de la caseína de la leche en reemplazo de su análogo azufrado (Van Dael y col., 1992; Weiss, 2005).

Las vías de excreción de Se en los rumiantes son principalmente las heces y la orina. Debido a la reducción del elemento hacia formas no absorbibles a nivel ruminal, una gran parte del mineral ingerido por vía oral es eliminado a través de las heces (Levander, 1986; Ceballos y col., 1996). La vía urinaria, si bien es utilizada para eliminar el Se administrado por vía oral, toma mayor importancia cuando el Se es administrado por vía parenteral, o cuando el aporte es superior a los requerimientos (Giese, 1984; Pedrosa y col., 2012). En este sentido, cuando los aportes son excesivos, el Se es también eliminado a través de la respiración como dimetil seleniuro (Levander, 1986; Burk y Hill, 2015).

Funciones biológicas (selenoproteínas)

Las diversas funciones biológicas del Se son llevadas a cabo por las selenoproteínas. Hasta el momento se encuentran descritas 30 selenoproteínas, de las cuales todas tienen Se-Cys en su estructura primaria (Kryukov y col., 2003; Beckett y Arthur, 2005). A diferencia de los compuestos azufrados donde el S aparece en su estado oxidado, en las selenoproteínas el Se se encuentra en su estado reducido (Combs y Combs, 1984). Esta diferencia les otorga

una mayor actividad, debido a que a pH fisiológico el grupo selenol del aminoácido Se-Cys aparece disociado, y por ende con capacidad de reaccionar rápidamente (Stadtman, 1996; Beckett y Arthur, 2005). Si bien la incorporación de la Se-Cys en las selenoproteínas depende de un codón UGA en los ARN mensajeros durante el proceso de la síntesis proteica, la síntesis de las selenoproteínas es altamente dependiente del aporte de Se al organismo (Behne y Kyriakopoulos, 2001; Driscoll y Copeland, 2003).

Las funciones del Se en el organismo han sido estudiadas, principalmente, en el contexto de su actividad antioxidante. De las selenoenzimas, cinco son glutatión peroxidases (GPx), tres son tioredoxin reductasas (TrxRs), otras tres son deiodinasas (D1 a D3) y de las restantes se destacan la SepP como una proteína transportadora de Se principalmente, y la selenofosfato sintetasa (SPS) que participa en la biosíntesis de Se-Cys (Santhosh Kumar y Priyadarsini, 2014).

Glutatión peroxidases

Existen 8 variedades de GPx descritas, de las cuales las GPx 1- 4 y la GPx 6 contienen Se en su estructura. Las GPx 1, 2, 3 y 6 tienen una estructura tetramérica con 4 átomos de Se en su estructura, y tendrían especificidad de actuar sobre el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos de bajo peso molecular como los hidroperóxidos de ácidos grasos (Flohe y col., 1973; Labunskyy y col., 2014). En cambio, la GPx4 posee una estructura monomérica y estaría involucrada en la reducción de hidroperóxidos de fosfolípidos complejos como el hidroperóxido de fosfatidilcolina y el hidroperóxido de colesterol, ambos asociados a las membranas celulares (Labunskyy y col., 2014). Aunque estas selenoenzimas tienen ubicación diferente, en general las GPx catalizan la reducción del

peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos evitando la formación y propagación de radicales libres, previniendo de esta manera, el daño oxidativo a nivel celular y tisular. Esta reducción es llevada a cabo oxidando el glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) (Mills, 1957; Rivera, 2005). Las isoformas más estudiadas son la GPx 1 y la GPx 4, responsables de la actividad antioxidante a nivel del citosol y de las membranas celulares, respectivamente (Fairweather-Tait y col., 2010; Hatfield y col., 2014). La GPx 4, además tiene diferentes expresiones denominadas GPx4c, citosólica, GPx4m, mitocondrial y estructural a nivel de la pieza media de los espermatozoides, y GPx4n, nuclear (Behne y Kyriakopoulos, 2001; Fairweather-Tait y col., 2010; Brigelius-Flohe y Flohé, 2019). La GPx 2 ejerce su función en el tracto digestivo y en los endotelios vasculares, mientras que la GPx 3 es responsable de la actividad antioxidante en los espacios extracelulares y el plasma (Behne y Kyriakopoulos, 2001; Heras y col., 2011).

Tioredoxin reductasas

Las TrxRs son oxidoreductasas localizadas intracelularmente, que participan a nivel del sistema redox de los tioles, en el sistema de las tioredoxinas (Trx) y en el sistema del glutatión y la enzima glutatión reductasa (GSH/GR; Labunskyy y col., 2014). Utilizando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como fuente de poder reductor, las TrxRs mantienen las Trx en estado reducido y reducen el GSSG a GSH. De esta manera intervienen indirectamente en la síntesis del ADN, el crecimiento celular, la apoptosis y la protección contra el daño oxidativo, y a pesar de su importancia, este grupo de selenoenzimas no está tan estudiado como las GPx (Mustacich, 2000; Tapiero y col., 2003; Papp y col., 2007). Las TrxR1, citosólica y nuclear, son capaces de reducir no solo a

las Trx, sino también varios compuestos de bajo peso molecular. Las TrxR3 se localizan principalmente en las mitocondrias y están involucradas en la reducción de las Trx mitocondriales. Por último, las tioredoxin/glutación reductasas (TrxGR), también conocidas como TrxR2, participan tanto en el sistema de las Trx, como en el sistema de la GSH/GR (Arner y Holmgren, 2000; Labunsky y col., 2014).

Desiodinasas

Las iodotironina desiodinasas (D1, D2 y D3) están involucradas en la regulación de la actividad de las hormonas tiroideas, debido a la desiodación que producen sobre ellas. La mayor parte de las hormonas tiroideas producidas por la glándula tiroides es secretada en su forma inactiva, la tiroxina (T4). Esta prohormona es convertida a su forma activa, la 3,3',5-triiodotironina (T3) mediante una reacción de desiodación catabolizada por la D1 y la D2. Por su parte, la D3 puede inactivar la T3 y la T4 formando las hormonas T2 y T3 reversa, respectivamente (Matamoros y col., 2003; Beckett y Arthur, 2005). La D1 ejerce su rol principal en la producción de T3 en la glándula tiroides y controla los niveles circulantes de dicha hormona, además se encuentra en hígado, riñón, músculo esquelético y en la grasa parda; mientras que las D2 y D3 ejercen su función de desiodación a nivel local, en el tejido u órgano específico, predominando la D2 en el sistema nervioso central, la pituitaria y la grasa parda, y la D3 en el sistema nervioso central y la placenta (Arthur y col., 1991; Arthur y col., 1992; Bianco y col., 2002).

Selenoproteína P

La SepP es una glicoproteína que contiene 10 átomos de Se por molécula como Se-Cys, y es responsable de aproximadamente el 60% del Se en el plasma. Si bien es producida en el hígado y secretada al plasma para el transporte y entrega de Se a los tejidos, también ha sido asociada a las membranas celulares, lo que sugiere un rol antioxidante (Mostenbocker y Tappel, 1982; Burk y Hill, 2009). Debido a que el Se está unido mediante un enlace covalente a la selenoproteína, su liberación implica la ruptura de la SepP antes de que la célula pueda utilizar el elemento (Wilson y Tappel, 1993; Burk y col., 2003). De esta manera, la SepP no es capaz de tomar y ceder Se, sino que únicamente lo entrega a nivel tisular, y solo cuando es captada por receptores específicos (Burk y Hill, 2015).

Selenofosfato sintetasa

Los mecanismos para la incorporación de Se dentro de la Se-Cys involucran un precursor de Se inorgánico, el selenofosfato. Este precursor es sintetizado a partir de seleniuro y adenosín trifosfato (ATP) por la enzima SPS (Papp y col., 2007). Es así como la SPS tiene un rol importante en el metabolismo del Se, no solo por la síntesis de las diferentes selenoproteínas a nivel de los tejidos, sino también en la síntesis de la SepP, encargada de transportar y entregar el Se al organismo (Labunskyy y col., 2014).

Diagnóstico de la deficiencia de Se en bovinos

Nutricional o fisiológicamente, el estatus de Se está determinado por cuatro factores: el consumo de Se, la retención en los tejidos, el Se funcional y finalmente su excreción. El consumo de Se dependerá del contenido de Se de los alimentos, y este de la cantidad de Se soluble en el suelo, así como también de la capacidad de las plantas para tomarlo y fijarlo en

sus proteínas. Como dijimos anteriormente, los forrajes aportarán principalmente Se-Met, y en menor proporción Se-Cys, selenatos y selenitos. En este sentido, los alimentos que contengan concentraciones de Se menores a 0,1 ppm serán considerados como deficientes, aunque las muestras compuestas de forraje han sido consideradas una alternativa imprecisa para evaluar la ingesta de Se en bovinos en pastoreo (Grant y Sheppard, 1983). La determinación del estatus de Se a partir de muestras animales ha sido considerada la mejor opción. La capacidad de retención del Se en los tejidos dependerá de la cantidad de Se absorbido, y por lo tanto de la cantidad de Se que llegue al intestino en forma soluble y sea capaz de evitar los antagonistas. Luego de ser absorbido viaja en plasma unido a albúminas y globulinas, y llega al hígado donde es metabolizado y volcado nuevamente al torrente sanguíneo en forma de SepP. La concentración de Se en el organismo puede ser determinada a partir de muestras de hígado, poco práctico para el diagnóstico a campo, de sangre entera, suero o plasma, siendo estos dos últimos prácticamente equivalentes en lo que respecta al contenido de Se (Puls, 1994; Wichtel., 1998; Hefnawy y Tórtora-Pérez, 2010). Dado que las muestras utilizadas para determinar el estatus de Se deben ser aquellas que puedan ser tomadas del animal de una manera simple, es que se utiliza generalmente sangre entera, suero o plasma. Estas muestras son de gran utilidad para determinar: a) la cantidad del elemento biológicamente activo, mediante la actividad de la GPx, o bien, b) la concentración de Se, como cantidad del elemento potencialmente activo (Wichtel, 1998; Hefnawy y Tórtora-Pérez., 2010).

Debido a que la regulación de los procesos de síntesis y expresión de las selenoproteínas demuestra que, en condiciones de deficiencia el sistema prioriza las enzimas a expresar, y la GPx es la última prioridad, la actividad de esta enzima en sangre refleja en buena manera que las necesidades del elemento han sido cubiertas en el animal (Behne y

Kyriakopoulos, 2001; Beckett y Arthur, 2005). Además, se ha demostrado que la actividad GPx en sangre entera está directamente relacionada con el aporte dietario de Se (Thompson y col., 1981). Debido a que existe una elevada correlación entre dicha actividad enzimática y la concentración de Se en el hígado y la sangre, se la considera un fiel indicador para evaluar el estatus de este mineral en los rodeos bovinos (Ceballos y col., 1999; Tapiero y col., 2003; Juniper y col., 2008). En este sentido, se define al estatus de Se como adecuado cuando la actividad GPx es mayor a 39,4 Unidades/mililitro de Hematocrito (U/ml Hto), mientras que se considera un estatus deficiente, bajo o marginal a valores de < 18, 18,5 – 30,3 y 30,3 – 39,4 U/ml Hto, respectivamente (Maas, 1990; Ceballos y col., 1999; Tapiero y col., 2003; Juniper y col., 2008; Randox, 2009).

LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RÍO SALADO Y EL RIESGO DE CARENCIA DE SELENIO

La Cuenca Deprimida del Río Salado (CDS), situada al noreste de la Provincia de Buenos Aires, es una zona sin aptitud agrícola, destinada a la cría bovina. Con aproximadamente 5,5 millones de bovinos, es una de las mayores zonas productoras de terneros del país (SENASA, 2017). La CDS posee características edafológicas homogéneas, en las que la topografía característica está compuesta por medias lomas, bajos tendidos y bajos dulces (Sánchez y col., 1976). En general, cuenta con un relieve plano con poco declive hacia el mar, con suelos compactos con predominio de materiales finos. Estas condiciones provocan una baja infiltración de agua, con rápido encharcamiento y tendencia al anegamiento (Barbagallo, 1983; Miretzky, 2001; Vázquez y col., 2009).

El sistema productivo de cría bovina de la CDS es principalmente pastoril y extensivo, y está basado en el consumo de pastizales naturales y pasturas naturalizadas como

principales fuentes de alimento (Némoz, 2013). Estos sistemas pastoriles son propensos a generar carencias minerales en los bovinos, entre ellas la de Se, debido principalmente a que los forrajes no siempre cubren los requerimientos de los animales (Suttle, 2010). Como se mencionó anteriormente, la forma química en la que se presenta el elemento en el suelo es el principal factor que determina su biodisponibilidad (Jones y col., 2017). Esta tiende ser limitada en suelos ácidos, poco oxigenados, con tendencia al anegamiento y de bajo potencial redox (Alloway, 2012; Sharma y col., 2015). Estos suelos se asocian a áreas geográficas con deficiencia endémica de Se (Fordyce y col., 2013), pudiendo afectar a los sistemas de cría (Campbell y col., 1995).

En Argentina, la deficiencia de Se está distribuida a lo largo del país (Cseh y col., 2013), y ha sido asociada con la aparición clínica de la carencia, especialmente la EMB o Miopatía degenerativa nutricional, en terneros y corderos (Odriozola y col., 2015; Rodriguez y col., 2016; Micheloud y col., 2018). Sin embargo, a pesar de que la EMB es la manifestación de la deficiencia más reconocida, las consecuencias subclínicas ocurren en forma previa a la aparición de la forma clínica y serían más frecuentes, aunque también más difíciles de percibir. La carencia subclínica se caracteriza por provocar fallas en el crecimiento, fallas inmunitarias y problemas reproductivos (Spears y col., 1986; Spears, 2000). Se ha observado en terneros que la deficiencia de Se perjudica su desarrollo provocando menor peso al destete (Koller y col., 1983; Spears y col., 1986). Además, la deficiencia reduce la migración quimiotáctica y la capacidad lítica de macrófagos y neutrófilos sanguíneos, tanto en animales jóvenes como en adultos (Hogan y col., 1990; Spears y Weiss, 2008; Hall y col., 2013). Se ha demostrado que la suplementación con Se de las madres mejora los niveles de inmunoglobulinas en sus terneros, así como también que la suplementación en terneros aumenta su respuesta humoral post vacunación (Awadeh y

col., 1998; Hall y col., 2013). Por otro lado, la deficiencia de Se puede resultar en problemas reproductivos como infertilidad, retención placentaria, abortos y el incremento en la incidencia de metritis y ovarios quísticos en las hembras (Spears y Weiss, 2008; Hefnawy y Tórtora-Pérez, 2010; Sordillo, 2013). En machos puede generar una disminución de la fertilidad debido a alteraciones en la síntesis de testosterona y en la producción de espermatozoides, con disminución en la longitud y circunferencia escrotal (Wu y col., 1979; Behne y col., 1996; Kaur y Kaur, 2000; Marai y col., 2009; Ahsan y col., 2014).

En la CDS los reportes de deficiencia de Se se limitan a la aparición de la manifestación clínica en terneros, pero se desconoce su ocurrencia subclínica al igual que el riesgo de sus consecuencias (Rodríguez y col., 2016).

El objetivo general del presente trabajo de tesis es conocer la prevalencia de la deficiencia de Se en los rodeos de cría bovina de la CDS y evaluar sus consecuencias productivas y reproductivas. Para cumplir con este objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares: Conocer el estatus de Se en rodeos bovinos de la CDS (Capítulo 2); Estudiar el efecto de la suplementación parenteral con Se sobre la ganancia de peso y la actividad GPx en terneros predestete y en un sistema de confinamiento (Capítulo 3); Estudiar el efecto de la suplementación con Se sobre el porcentaje de preñez en vacas inseminadas a tiempo fijo y sobre la calidad de los espermatozoides bovinos cultivados *in vitro* (Capítulo 4); y Establecer el efecto de distintas concentraciones de Se sobre la maduración de ovocitos bovinos y su capacidad de desarrollo posterior (Capítulo 5).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz MH, Iqbal Z. Role of selenium in male reproduction - a review. *Anim Reprod Sci.* 2014; 146:55–62.
2. Alloway BJ. Heavy Metals in Soils: Trace Elements and Metalloids in Soils and their Bioavailability. Third edition 2013. Dordrecht: Springer.
3. Ammerman CB, Miller SM. Selenium in ruminant nutrition: a review. *J. Dairy Sci.* 1975; 58(10): 1561-1577.
4. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 6102–6109.
5. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ. Selenium in the immune system. *J Nutr.* 2003; 133 (5)1:1457S-9S. doi: 10.1093/jn/133.5.1457S.
6. Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ. The role of selenium in thyroid hormone metabolism and effects of selenium deficiency on thyroid hormone and iodine metabolism. *Biol Trace Elem Res.* 1992; 34(3), 321–325. doi:10.1007/bf02783686.
7. Arthur JR, Nicol F, Grant E, Beckett GJ. The effects of selenium deficiency on hepatic type-I iodothyronine deiodinase and protein disulphide-isomerase assessed by activity measurements and affinity labelling. *Biochem J.* 1991; 274(1), 297–300. doi:10.1042/bj2740297.
8. Aspila, P. Metabolism of selenite, selenomethionine and feed-incorporated selenium in lactating goats and dairy cows. *A F Sci.* 1991; 63(1), 1-74. doi.org/10.23986/afsci.72394.
9. Awadeh FT, Kincaid RL, Johnson KA. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and

- calves. *J Anim Sci.* 1998; 76(4):1204-1215. doi: 10.2527/1998.7641204x.
10. Barbagallo J. Las áreas anegables de la Pampa Deprimida. Un planteo agrohidrológico para su solución. Coloquio Intern. De Grandes Llanuras. Unesco. VIII, 789-827. 1983. Olavarría. Provincia de Buenos Aires.
 11. Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol.* 2005; 184(3): 455-465.
 12. Behne D, Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 2001; 21, 453-473.
 13. Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *Reproduction.* 1996; 106:291-297. doi.org/10.1530/jrf.0.1060291.
 14. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 2002; 23(1), 38–89. doi:10.1210/edrv.23.1.0455.
 15. Brigelius-Flohe R, Flohé L. Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 2019; 1;33(7):498-516. doi:10.1089/ars.2019.7905.
 16. Burk RF, Hill KE. Regulation of selenium metabolism and transport. *Annu. Rev. Nutr.* 2015; 35, 109-134.
 17. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P-Expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(11), 1441–1447. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.026.
 18. Campbell JR, Jim GK, Booker CW, Guichon PT. A survey of the selenium status of beef cows in Alberta. *Can Vet J.* 1995; 36.

19. Ceballos A, Wittwer F. Metabolismo del selenio en ruminantes. *Arch. Med. Vet.* 1996; 28: 5-18.
20. Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Quiroz E, Böhmwal HL. Actividad de Glutación Peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de Selenio. *Pesq. agropec. bras.* 1999; 34 (12): 2331-2338.
21. Combs GF, Combs SB. The nutritional biochemistry of selenium. *Annu Rev Nutr.* 1984; 4:257-80. doi: 10.1146/annurev.nu.04.070184.001353.
22. Cousins, R. 2012. Trace Element Absorption and Transport. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 2nd. 1951-1961. doi:10.1016/B978-0-12-382026-6.00072-5.
23. Cseh S, Drake M, Brambilla E. Deficiencia de selenio en bovinos según época del año y región en Argentina. *Revista de Producción Animal.* 2013; 33 (1):21.
24. Davidson WB, Kennedy DG. Synthesis of [75Se]Selenoproteins is greater in selenium-deficient sheep. *J Nutr.* 1993; 123(4): 689-694. doi:10.1093/jn/123.4.689.
25. Driscoll DM, Copeland PR. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu Rev Nutr.* 2003; 23:17-40. doi: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073318.
26. Ellis DR, Salt DE. Plants, selenium, and human health. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003; 6,273–279. doi:10.1016/S1369-5266(03)00030-X.
27. Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J of Clin Nutr.* 2010; 91(5): 1484S-1491S. doi:10.3945/ajcn.2010.28674j
28. Fairweather-Tait SJ. Bioavailability of selenium. *Eur J Clin Nutr.* 1997; 51 1:S20-3.
29. Flohe L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Letts.* 1973; 32(1):132–134. doi: 10.1016/0014-5793(73)80755-0.

30. Fordyce FM. 2013. Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. Essentials of Medical Geology. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-4375-5_16.
31. Fordyce, F. Selenium Geochemistry and Health. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. 2007; 36(1), 94–97. doi:10.1579/0044-7447(2007)36[94:sgah]2.0.co;2
32. Frost DV. Selenium as feed additive: A critique. *Feedstuffs*. 1973; 45 (50):26.
33. Galbraith, M.L.; Vorachek, W.R.; Estill, C.T.; Whanger, P.D.; Bobe, G.; Davis, T.Z.; Hall, J.A. Rumen microorganisms decrease bioavailability of inorganic selenium supplements. *Biol. Trace Elem. Res.* Epub 2015. doi: 10.1007/s12011-015-0560-8.
34. Gasiewicz TA, Smith JC. The metabolism of selenite by intact rat erythrocytes in vitro. *Chem Biol Interact*. 1978; 21: 299–313.
35. Giese WW. Isotope techniques in studies of selenium deficiency and toxicity syndromes in farm animals. En: Proceedings of a Consultants Meeting on the Application of Nuclear Techniques in the Study of Tropical Animal Diseases. Pp 97-112. FAO/IAEA Division of Isotope and Radiation Applications of Atomic Energy for Food and Agricultural Development, Vienna, 1984.
36. Grant AB, Sheppard AD. Selenium in New Zealand pastures. *N Z Vet J*. 1983; 31, 131-136.
37. Gupta M, Gupta S. An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. *Front. PlantSci*. 2017; 7:2074. doi: 10.3389/fpls.2016.02074.
38. Hall JA, Bobe G, Vorachek WR, Hujeriletu, Gorman ME, Mosher WD, Pirelli GJ. Effects of feeding selenium-enriched alfalfa hay on immunity and health of weaned beef calves. *Biol Trace Elem Res*. 2013; 156(1-3):96-110.

39. Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenium and selenocysteine roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem. Sci.* 2014; 39, 112-120.
40. Hefnawy AEG, Tórtora-Pérez JL. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Res.* 2010; 89(2-3), 185–192. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.12.042.
41. Heras I, Palomo M, Madrid Y. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011; 400, 1717-1727.
42. Hidioglou M, Heaney DP, Jenkins KJ. Metabolism of inorganic selenium in rumen bacteria. *Can J Physiol Pharm.* 1968; 46 (2):229-232.
43. Hogan JS, Smith KL, Weiss WP, Todhunter DA, Schockey WL. Relationships among vitamin E, selenium, and bovine blood neutrophils. *J Dairy Sci.* 1990; 73(9):2372-8. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78920-5.
44. Hogue DE. 1958. Vitamin E, selenium and other factor related tu nutritional muscular dystrophy in lambs. Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manufacturers. Nueva York, Estados Unidos.
45. House WA, Bell AW. Sulfur and selenium acretion in the gravid uterus during late gestation in Holstein cows, *J. Dairy Sci.* 1994; 11: 1860-1869.
46. Jenkins KJ, Hidioglou M. A review of selenium/vitamin E responsive problems in livestock: A case for selenium as a feed additive in Canada. *Can. J. Anim. Sci.* 1972; 52: 591.
47. Johnson CC, Ge X, Green KA, Liu X. Selenium distribution in the local environment of selected villages of the Keshan Disease belt, Zhangjiakou District, Hebei Province, People's Republic of China. *Appl. Geochem.* 2000; 15 (3), 385-401.

48. Jones GD, Droz B, Greve P, Gottschalk P, Poffet D, McGrath SP, Seneviratne SI, Smith P, Winkel LHE. Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017; 114: 2848-2853. doi: 10.1073/pnas.1611576114.
49. Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales E, Bertin G. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2008; 86:3100-3109.
50. Kaur R, Kaur K. Effects of dietary selenium on morphology of testis and cauda epididymis in rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2000; 44:265–272.
51. Koenig KM, Rode LM, Cohen RDH, Buckley WT. Effects of diet and chemical form of selenium metabolism in sheep. *J. Anim. Sci.* 1997; 75: 817-827.
52. Koller LD, South PJ, Exon JH, Whitbeck GA. Selenium deficiency of beef cattle in Idaho and Washington and a practical means of prevention. *Cornell Vet.* 1983; 73(4):323-32.
53. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 2003; 300:1439–1443
54. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol Rev.* 2014; 94(3): 739–777. doi:10.1152/physrev.00039.2013.
55. Levander OA. 1986. Selenium. En: Mertz, W. Trace elements in human and animal nutrition. Vol. 2. 5 ed., Academic Press, Inc., Orlando.
56. Li HF, McGrath SP, Zhao FJ. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol.* 2008; 178,92-102.

57. Li Z, Liang D, Peng Q, Cui Z, Huang J, Lin Z. Interaction between selenium and soil organic matter and its impact on soil selenium bioavailability: A review. *Geoderma*. 2017; 295:69–79. doi: 10.1016/j.geoderma.2017.02.019.
58. Lyons G, Lewis J, Lorimer M, Holloway R, Brace D, Stangoulis J, Graham R. High-selenium wheat: Agronomic biofortification strategies to improve human nutrition. *Agriculture & Environment*. 2004; 22. 171-178.
59. Maas J. Deficiencia de Se en el ganado bovino. En: XVI Congreso Mundial de Buiatria. Salvador, Bahia, Brasil. 1990; pp. 3-13.
60. Marai IFM, El-Darawany AHA, Ismail ESAF, Abdel-Hafez MAM. Reproductive and physiological traits of Egyptian Suffolk rams as affected by selenium dietary supplementation and housing heat radiation effects during winter of the sub-tropical environment of Egypt. *Arch Anim Breed*. 2009; 52, 402-409.
61. Matamoros R, Contreras PA, Wittwer F, Mayorga, MI. Hipotiroidismo en rumiantes. *Arch. Med. Vet*. 2003; 35(1), 1-11. doi:10.4067/S0301-732X2003000100001.
62. McDowell, LR.1992. Minerals in Animal and Human Nutrition. Academic Press, Inc., San Diego, California, EE.UU.
63. Mehdi Y, Dufrasne I. Selenium in Cattle: A Review. *Molecules*. 2016; 21(4): 545. doi: 10.3390/molecules21040545.
64. Micheloud JF, Araoz V, Delgado FO, Colque-Caro LA, Rosa DE, Mattioli GA. Distrofia muscular nutricional en corderos de raza Dorper en el Noroeste Argentino. *Rev. med. vet*. 2018; 99(2):13-16.
65. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Biol. Chem*. 1957; 229: 189-197.

66. Miretzky, PS. Procesos geoquímicos en la cuenca baja del Río Salado, Provincia de Buenos Aires [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3395_Miretzky.pdf.
67. Mostenbocker MA, Tappel AL. A selenocysteine containing seleniujm transport protein in rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982; 719: 147-153.
68. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* 2000; 346: 1-8. doi: 10.1042/bj3460001.
69. Muth OH, Oldfield JE, Remmert LF, Schubert JR. Effects of selenium and vitamin E on White muscle disease. *Science.* 1958; 128:1090.
70. Némoz JP. Principales características de la actividad ganadera vacuna en el área de la EEA Cuenca del Salado. Informe INTA-RIAN. 2013. Disponible en <https://inta.gob.ar/documentos/principales-caracteristicas-de-la-actividad-ganadera-vacuna-en-elarea-de-la-eea-cuenca-del-salado>.
71. Odriozola E, Armendano J, Schild C, García J, Cora J, Brambilla E, Fernández E, Quiroga A, Mattioli G, Morrell E, Cantón G. Miopatía nutricional con desplazamiento dorsal bilateral de la escapula en bovinos: primer reporte de un caso en Argentina. 9nas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. 2015.
72. Painter, EP. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. *Chem. Rev.* 1941; 28, 179–187.
73. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9(7), 775–806. doi:10.1089/ars.2007.1528.

74. Pedrosa LFC, Motley AK, Stevenson TD, Hill KE, Burk RF. Fecal selenium excretion is regulated by dietary selenium intake. *Biol Trace Elem Res.* 2012;149(3):377-81. doi: 10.1007/s12011-012-9430-9.
75. Preedy VR. 2015. Selenium. Food and nutritional components in focus. The Royal Society of Chemistry. Cap 2, pp: 16-34. doi 10.1039/9781782622215.
76. Puls R, 1994, Mineral levels in Animal Health, 2 nd edition. Sherpa International Clarbrook, Canada.
77. Randox Laboratories. Technical brief. Crumlin, Reino Unido. 2009.
78. Reilly C. 1996. Selenium in food and health. 2 ed. Springer, Nueva York, EE.UU.
79. Rivera RE, Christensen VL, Edens FW, Wineland MJ. Influence of selenium on heat shock protein 70 expression in heat stressed turkey embryos (*Meleagris gallopavo*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005; 142:427-432. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.09.006.
80. Rodriguez AM, Romero RA, Odriozola ER, Garcia JA, Brambilla EC, Armendano JI, Canton GJ. Enfermedad del músculo blanco en terneros para cría en Provincia de Buenos Aires. X Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE). 2016.
81. Sánchez RO, Ferrer JA, Duymovich OA, Hurtado MA. Estudio pedológico integral de los partidos de Magdalena y Brandsen (provincia de Buenos Aires). *LEMIT, anales.* 1976. Serie II, N° 310.
82. Santhosh Kumar B, Priyadarsini KI. Selenium nutrition: How important is it?. *Biomedicine & Preventive Nutrition.* 2014; 4:333–341
83. Schrauzer GN. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr.* 2000; 130(7):1653-6.

84. Schroeder HA, Mitchener M. Selenium and tellurium in mice. Effects on growth, survival and tumors. *Arch Environ Health*. 1972; 24: 66.
85. Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 1957; 79, 3292–3293.
86. Senasa. Estadísticas ganaderas. [Consulta diciembre 2017]. Disponible en <http://senasa.gob.ar/información/informes-y-estadísticas/movimientos>.
87. Serra A, Nakamura K, Matsui T, Harumoto T, Fujihara T. Inorganic selenium for sheep I. Selenium balance and selenium levels in the different ruminal fluid fractions. *Asian Australas J Anim Sci*. 1994; 7(1):83–89.
88. Sharma VK, Mc Donald TJ, Sohn M, Anquandah GAK, Pettine M, Zboril R. Biogeochemistry of selenium. A review. *Environ Chem Lett*. 2015; 13:49-58. doi:10.1007/s10311-014-0487-x.
89. Sordillo LM. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. *Vet Med Int*. 2013; 154045. doi: 10.1155/2013/154045.
90. Sors TG, Ellis DR, Na GN, Lahner B, Lee S, Leustek T, Pickering IJ, Salt DE. Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. *Plant J*. 2005; 42:785-797. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02413.x
91. Spears JW, Harvey RW, Segerson EC. Effects of marginal selenium deficiency and winter protein supplementation on growth, reproduction and selenium status of beef cattle. *J. Anim Sci*. 1986; 63(2):586-94.
92. Spears JW, Weiss PW. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J*. 2008; 176(1): 70-76.

93. Spears JW, Weiss WP. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J.* 2008; 176: 70–76. doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.015.
94. Spears JW. Micronutrients and immune function in cattle. *Proc Nutr Soc.* 2000; 59(4):587-94. doi: 10.1017/s0029665100000835.
95. Stadtman TC. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65: 83–100.
96. Suttle NF. 2010. Mineral Nutrition of Livestock, 4 ed. Pp 377–425. Oxfordshire, Reino Unido. doi:10.1079/9781845934729.0255.
97. Tapiero H, Townsend D, Tew K. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(3-4), 134–144. doi: 10.1016/S0753-3322(03)00035-0.
98. Thompson KG, Fraser AJ, Harrop BM, Kirk JA, Bullians J, Cordes DO. Glutathione peroxidase activity and selenium concentration in bovine blood and liver as indicators of dietary selenium intake. *N Z Vet J.* 1981; 29, 3-6.
99. Turner RJ, Weiner JH, Taylor DE. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *Biometals.* 1998; 11(3):223-7. doi: 10.1023/a:1009290213301.
100. Underwood EJ. 1971 Trace Elements in Human Animal Nutrition, 3rd ed., Academic, Nueva York, Estados Unidos.
101. Van Dael P, Shen L, Van Renterghem R, Deelstra H. Selenium content of goat milk and its distribution in protein fractions. *Z Lebensm Unters Forch.* 1992; 195: 3–7. doi: 10.1007/BF01197830.
102. Van Ryssen JB, Schroeder GE. Effect of heat processing of protein sources on the disappearance of their selenium from mobile bag in the digestive tract of dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 2003; 107: 15-27.

103. Van Saun RJ, Herdt TH, Stowe HD. Maternal and fetal selenium concentrations and their interrelationships in dairy cattle. *J. Nutr.* 1989; 119: 1128-1137.
104. Van Saun RJ. Rational approach to selenium supplementation essentials. *Feedstuffs.* 1990; 15: 15.
105. Vázquez PM, Cabria FN, Rojas MC, Calandroni MB. Riesgo de anegamiento: estimaciones para la Cuenca Baja del Río Salado. *Cienc. suelo* [online]. 2009; 27:237-246.
106. Weiss WP. Selenium Sources for Dairy Cattle. Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, Indiana, Estados Unidos, 2005; pp.61-71.
107. White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracklen WP, Spiby RE, Meacham MC, Mead A, Harriman M, Trueman LJ, Smith BM, Thomas B, Broadley MR. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 2004; 55:1927-1937. doi:10.1093/jxb/erh192.
108. Wichtel JJ. A review of selenium deficiency in grazing ruminants Part 2: Towards a more rational approach to diagnosis and prevention. *N Z Vet J.* 1998; 46:2, 54-58. doi:10.1080/00480169.1998.36056.
109. Wilson DS, Tappel AL. Binding of plasma selenoprotein P to cell membranes. *J. Inorg. Biochem.* 1993; 51: 707–714.
110. Wu AS, Oldfield JE, Shull LR, Cheeke PR. Specific effect of selenium deficiency on rat sperm. *Biol Reprod.* 1979; 20(4):793-8. doi: 10.1095/biolreprod20.4.793. PMID: 454766.

CAPÍTULO II

RELEVAMIENTO DEL ESTATUS DE SELENIO EN RODEOS BOVINOS DE LA CUENCA DEPRIMIDA DEL RIO SALADO

INTRODUCCIÓN

La producción de cría bovina, realizada sobre sistemas pastoriles extensivos, sin suplementación mineral, puede verse afectada por carencias minerales, entre ellas la de Se (Se; Ammerman and Miller, 1975; Hefnawy y Tórtora-Pérez, 2010; Suttle, 2010). Esto es debido a que los forrajes no siempre cubren los requerimientos de Se, establecidos en 0,1 ppm (NRC, 2016). La concentración de Se en los forrajes está condicionada por su biodisponibilidad en el suelo. La forma química en la que se presenta el elemento es el principal factor que determina dicha biodisponibilidad (Jones y col., 2017), y está condicionada en gran medida por las características del suelo, dentro de las cuales se encuentra el pH, y por variables ambientales como las precipitaciones (Sharma y col., 2015; Jones y col., 2017; Li y col., 2017). La biodisponibilidad del Se para los forrajes tiende a ser limitada en suelos ácidos, poco oxigenados, con tendencia al anegamiento y de bajo potencial redox (Alloway, 2012; Sharma y col., 2015). Estos suelos se asocian a áreas geográficas con deficiencia endémica de Se (Fordyce y col., 2013), pudiendo afectar a los sistemas de cría (Campbell y col., 1995).

La CDS es una zona situada al noreste de la Provincia de Buenos Aires principalmente dedicada a la cría bovina. Los sistemas productivos son de base pastoril y extensivos, y con aproximadamente 5,5 millones de bovinos es una de las mayores zonas

productoras de terneros del país (SENASA, 2017). Por otro lado, la CDS es una zona de características edafológicas homogéneas, con medias lomas, bajos tendidos y bajos dulces (Sánchez y col., 1976). Sin embargo, un relieve plano con poco declive hacia el mar, y suelos compactos con predominio de materiales finos, provocan una baja infiltración de agua, con rápido encharcamiento y tendencia al anegamiento (Barbagallo, 1983; Miretzky, 2001; Vázquez y col., 2009). Las zonas bajas son las áreas de escurrimiento por excelencia, lo cual, sumado a una napa freática cercana a la superficie durante todo el año, produce un movimiento de sales que les confieren un carácter alcalino (Miretzky, 2001). En la CDS se ha reportado recientemente la manifestación clínica de la deficiencia de Se en bovinos (Rodríguez y col., 2016), sin embargo, aún no se conoce si dicha deficiencia está presente de manera subclínica.

La deficiencia clínica de Se se presenta como un cuadro de elevada mortalidad en terneros, llamado EMB o Miopatía degenerativa nutricional, debido a las lesiones oxidativas que genera en músculos cardíaco y esquelético (Rodríguez y col., 2016; Micheloud y col., 2018). En sistemas pastoriles sin suplementación mineral, la carencia de Se durante la gestación predispone a los terneros a sufrir EMB (Walder y Van der Mayer, 2011). La forma subclínica de la carencia precede a la EMB y puede pasar desapercibida, generando pérdidas productivas importantes (Larson, 2005; Enjalbert y col., 2006; Kegley y col., 2016). Estas pérdidas suelen manifestarse debido a fallas en el crecimiento en animales jóvenes, fallas inmunológicas y baja eficiencia reproductiva (Spears y col., 1986; Spears, 2000). Se ha descrito que la deficiencia de Se puede perjudicar el desarrollo de los terneros, provocando menor peso al destete (Koller y col., 1983; Spears y col., 1986); y generar fallas en la fertilidad que han sido claramente asociadas a la deficiencia de Se en vacas lecheras, especialmente como consecuencia de la mayor incidencia de infecciones asociadas al parto

(Mehdi y Dufrasne, 2016). En sistemas de cría, en cambio, los antecedentes no son concluyentes (Waldner y Van De Weyer, 2011).

En bovinos, la deficiencia de Se puede ser diagnosticada a partir de los niveles de actividad de la enzima GPx en sangre. La actividad de esta enzima está directamente relacionada con el aporte dietario de Se, y debido a que existe una elevada correlación entre dicha actividad enzimática y la concentración de Se en hígado y sangre, se la considera un fiel indicador para evaluar el estatus de este mineral en los rodeos bovinos (Ceballos y col., 1999; Tapiero y col., 2003, Juniper y col., 2008). Como marcador biológicamente activo del estatus de Se, la actividad GPx sanguínea, evaluada como U/ml Hto, permite definir el estatus de los bovinos como deficiente (<18), bajo ($18,5 - 30,3$), marginal ($30,3 - 39,4$) y adecuado ($> 39,4$) (Maas, 1990; Ceballos y col., 1999; Tapiero y col., 2003; Juniper y col., 2008; Randox, 2009).

En consecuencia, se diseñaron 2 experimentos con el fin de conocer 1) el estatus de Se en hembras adultas y terneros de rodeos de cría de la CDS a partir de la actividad GPx en un relevamiento de 6 partidos de dicha cuenca y, 2) el efecto de la estación del año sobre la actividad GPx de los rodeos de cría en uno de los partidos de la CDS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Protocolo número 51-3-15T).

Animales y establecimientos

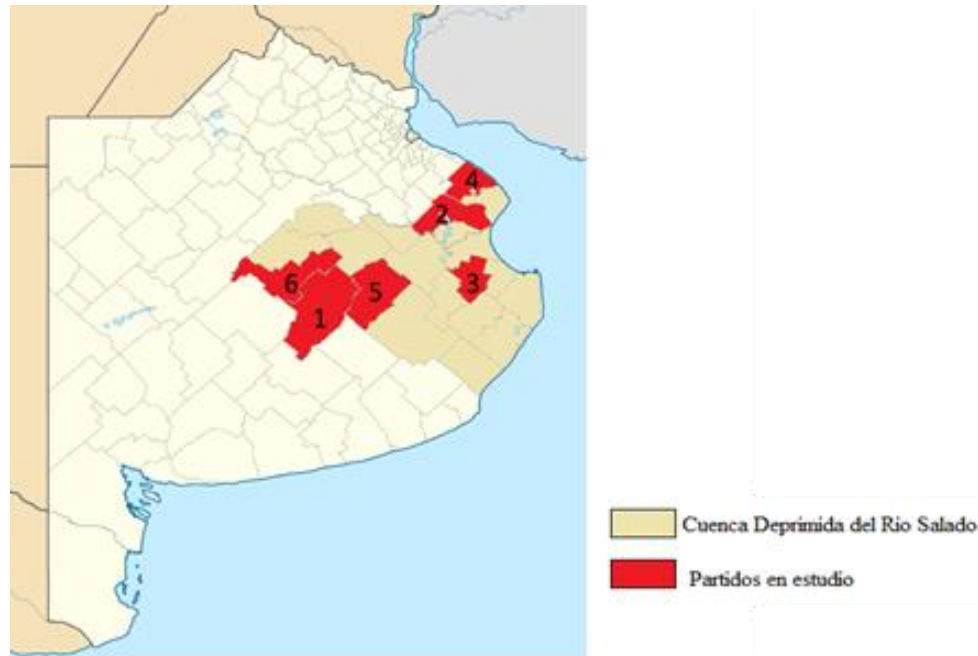
Los establecimientos utilizados para este ensayo reunieron las siguientes condiciones: estar ubicado en la CDS y dedicarse a la cría bovina bajo un sistema de producción sobre pastizales naturales y/o naturalizados, sin suplementación de mezclas minerales, granos de cereales y/o suplementos nutricionales, y poseer facilidades de acceso durante todo el año.

Relevamiento del estatus de Se a través de la actividad GPx en rodeos bovinos de la CDS

El relevamiento se realizó entre los meses de febrero del año 2016 y septiembre del año 2019, incluyó 35 establecimientos dedicados a la cría bovina, ubicados en los partidos de Azul, Chascomús, Dolores, Magdalena, Rauch, y Tapalqué (Figura 2.1).

En cada establecimiento se escogieron de manera aleatoria 20 animales y se les tomaron muestras de sangre. De los 20, 10 animales fueron hembras reproductoras que habían parido al menos una vez, y tenían más de 2 años de edad (definidos en este estudio como “vacas”), y los 10 restantes fueron animales con menos de 2 años y sin distinción de sexo (definidos como “terneros”). Los animales seleccionados se encontraban en buen estado general, sin presentación de secreciones oculares, nasales o diarrea ni antecedentes de tratamientos recibidos durante al menos 3 meses previos al muestreo.

Figura 2.1. Ubicación geográfica de la CDS y de los partidos muestreados.

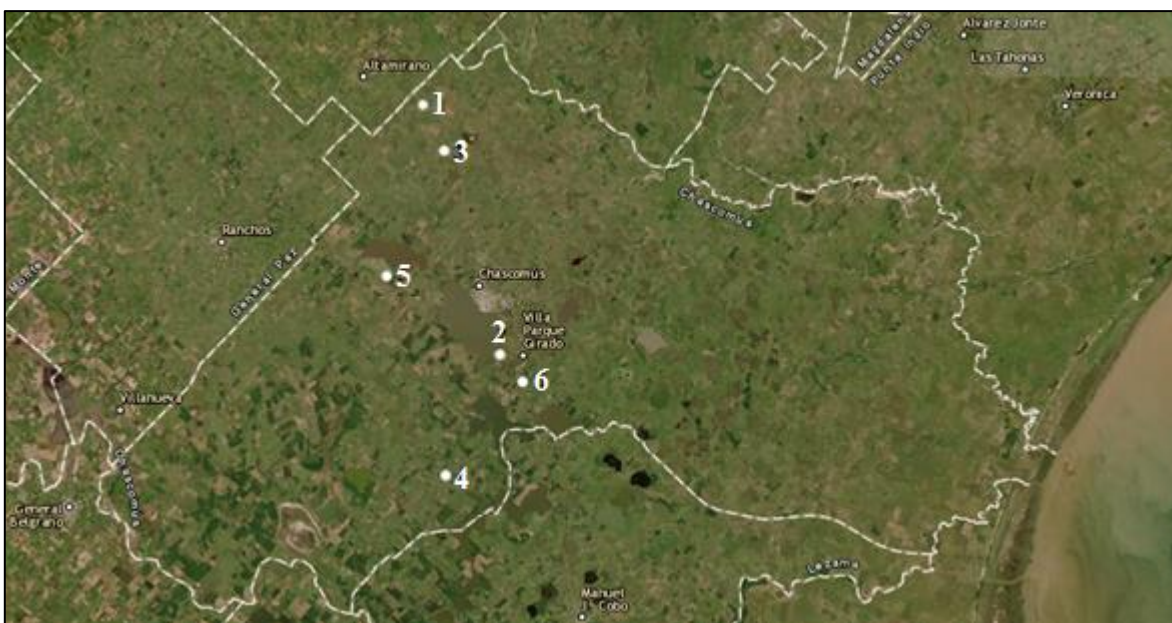


Ubicación geográfica de la Cuenca Deprimida del Río Salado (CDS) y de los partidos muestreados en el relevamiento dentro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. 1- Azul; 2- Chascomús; 3- Dolores; 4- Magdalena; 5- Rauch; 6- Tapalqué.

Asociación entre la actividad GPx en bovinos y la estación del año

Este experimento se llevó a cabo durante los años 2017 y 2018, en 6 establecimientos dedicados a la cría bovina, ubicados en el Partido de Chascomús (Figura 2.2). En cada establecimiento se tomaron muestras de sangre de 20 animales como se describió en el Objetivo 1 (10 del plantel de hembras reproductoras con más de 2 años (vacas) y 10 animales con menos de 2 años y sin distinción de sexo (terneros)) durante las cuatro estaciones del año. En todos los muestreos, los animales seleccionados se encontraban en buen estado general, sin presentación de secreciones oculares, nasales o diarrea ni antecedentes de tratamientos recibidos durante al menos 3 meses previos al muestreo.

Figura 2.2. Ubicación geográfica de los establecimientos en estudio dentro del partido de Chascomús.



Vista satelital de la ubicación geográfica de los establecimientos en estudio dentro del partido de Chascomús, Buenos Aires, Argentina. Los establecimientos están indicados por puntos blancos dentro del partido e identificados con números correlativo del 1 al 6 (Establecimientos: 1- 35°24'18.9"S 58°06'10.7"W; 2- 35°37'23.7"S 57°59'30.7"W; 3- 35°25'40.2"S 58°03'47.4"W; 4- 35°44'37.5"S 58°03'25.8"W; 5- 35°32'52.9"S 58°07'28.6"W; y 6- 35°38'59.7"S 57°57'51.7"W).

Recolección de sangre y determinaciones de hematocrito y actividad GPx

Las muestras de sangre se tomaron por venopunción yugular utilizando una jeringa y aguja estériles por animal. Se recolectaron en tubos plásticos con heparina sódica como anticoagulante. Los tubos se mantuvieron refrigerados durante el muestreo y se trasladaron al laboratorio en recipientes térmicos con hielo. En el laboratorio se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento.

El porcentaje de Hto se determinó por centrifugación en capilar (microhematocrito), empleando una microcentrífuga Rolco CH 24 (5 minutos a 12000 rpm). La actividad GPx en sangre entera se evaluó mediante método colorimétrico utilizando el kit comercial RANSEL (Cat. Num. RS 504, Laboratorio Randox Ltd, Crumlin, Reino Unido) y un espectrofotómetro UV/VIS (Lambda 25 - Perking Elmer), según el método de Paglia y Valentine (1967). La enzima GPx cataliza la oxidación de Glutación (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. En presencia de la enzima Glutación Reductasa (GR) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), el Glutación oxidado (GSSG) es inmediatamente convertido en su forma reducida con la consecuente oxidación del NADPH a NADP⁺. Brevemente, se diluyeron 0,05 ml de sangre en 2 ml del diluyente suministrado por el kit. Luego 0,01 ml de sangre diluida y hemolizada fueron colocados en tubos de vidrio con 0,5 ml del reactivo conformado por 4 mmol/l de GSH, 0,5 U/l de GR y 0,34 mmol/l de NADPH y 0,02 ml de hidroperóxido de cumeno. Para el blanco se utilizaron 0,01 ml de agua destilada. La absorbancia inicial y luego de 2 minutos fueron medidas para las muestras y blancos a 340 nm en el espectrofotómetro. Los controles de calidad se realizaron utilizando RANSEL Control. La concentración de GPx se calculó como U/l del hemolizado = $8412 \times \Delta A$ a 340nm, donde ΔA = variación entre la absorbancia inicial y a los 2 min. Luego se multiplicó por el factor de dilución (41) y se realizó el cociente para cada muestra por su valor de hematocrito. La actividad GPx fue finalmente expresada en U/ml Hto.

Diseño experimental

Relevamiento del estatus de Se a través de la actividad GPx en rodeos bovinos de la CDS

En el experimento 1 se realizó un estudio observacional del estatus de Se en rodeos bovinos que incluyó 350 vacas y 350 terneros pertenecientes a 35 establecimientos dedicados a la cría bovina, ubicados en los partidos de Azul, Chascomús, Dolores, Magdalena, Rauch, y Tapalqué.

Los resultados de actividad de GPx están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm error estándar de la media (EEM). La distribución de los animales (vacas y terneros de los diferentes partidos) según su estatus de Se está expresado en porcentajes.

Asociación entre la actividad GPx en bovinos y la estación del año

En el experimento 2 se realizó un estudio observacional longitudinal en bloques completos al azar, para lo cual se analizó el estatus de Se en rodeos bovinos, durante las cuatro estaciones del año. Se incluyeron 6 establecimientos, con 10 vacas y 10 terneros de cada uno, dedicados a la cría bovina y ubicados en el Partido de Chascomús.

Los resultados de actividad de GPx están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM. La distribución de los animales (vacas y terneros de los diferentes partidos) según su estatus de Se está expresado en porcentajes.

Análisis estadístico

En el experimento 1 el modelo estadístico incluyó el efecto de la categoría (vaca vs. ternero), el partido (Azul vs. Chascomús vs. Dolores vs. Magdalena vs. Rauch, vs. Tapalqué) y sus interacciones como variables fijas y el animal como variable aleatoria. En el experimento 2 el modelo estadístico incluyó el efecto de la categoría (vaca vs. ternero), el establecimiento (1 vs. 2 vs. 3 vs. 4 vs. 5 vs. 6), la estación del año (Primavera vs. Verano vs.

Otoño vs. Invierno) y sus interacciones como variables fijas y el animal como variable aleatoria. La actividad GPx se analizó utilizando una distribución normal, con el procedimiento GLIMIX de SAS (SAS 9.4, Institute, Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos). Para analizar la distribución de los animales según su estatus de Se, se tuvo en cuenta a los animales que conforman la muestra de manera aislada y se los separó según su estatus en deficiente, bajo, marginal y adecuado como se explicó anteriormente, y se analizó el porcentaje de animales con estatus adecuado utilizando el procedimiento GENMOD de SAS (SAS 9.4, Institute, Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos). Los resultados de actividad GPx están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM. La distribución de los animales con estatus adecuado de Se está expresado como porcentaje. La significación estadística se estableció en $P < 0,05$ y $P \leq 0,10$ para tendencia e interacciones.

RESULTADOS

Relevamiento del estatus de Se en rodeos bovinos de la CDS

La actividad GPx de los animales muestreados en la CDS se detallan en la Tabla 2.1. La actividad GPx no fue diferente según la categoría animal ($P > 0,05$; Tabla 2.1), pero se vio modificada por los partidos ($P < 0,01$; Tabla 2.1). Además, se observó una interacción categoría*partido sobre la actividad GPx, que demuestra una mayor actividad de la enzima en las vacas en el partido de Chascomús, mientras que en los partidos de Dolores y Magdalena se registró una mayor actividad GPx en los terneros; siendo la actividad enzimática similar entre categorías en los partidos de Azul, Rauch y Tapalqué ($P < 0,01$; Figura 2.3).

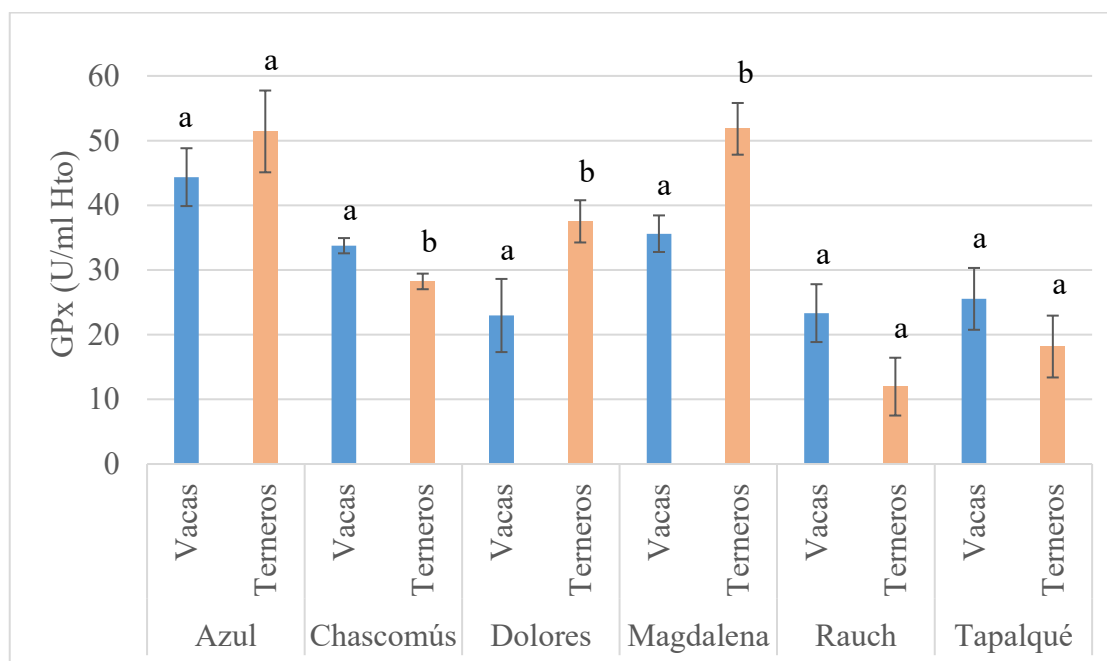
Tabla 2.1. Actividad GPx en sangre entera según la categoría animal y el partido de la CDS.

Variable	Actividad GPx (U/ml Hto)	EEM	Valor de P
Categoría animal			
Vacas	30,92	1,70	0,35
Terneros	33,18	1,75	
Partidos de la CDS			
Azul	47,88 ^a	3,87	<0,01
Chascomús	30,98 ^b	0,84	
Dolores	30,23 ^{bc*}	3,26	
Magdalena	43,71 ^a	2,44	
Rauch	17,64 ^c	3,16	
Tapalque	21,84 ^{c*}	3,37	

La actividad GPx en sangre entera se determinó según el método de Paglia y Valentine (1967).

Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados. CDS: Cuenca Deprimida del Río Salado; GPx: glutatión peroxidasa; U/ml Hto: unidades/ mililitro de hematocrito; EEM: Error estándar de la media. ^{a-c} Valores con diferente superíndice dentro de cada columna indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$); Valores con (*) dentro de cada columna tendieron a ser diferentes ($P < 0,10$). Valor adecuado: $> 39,4$ U/ml Hto.

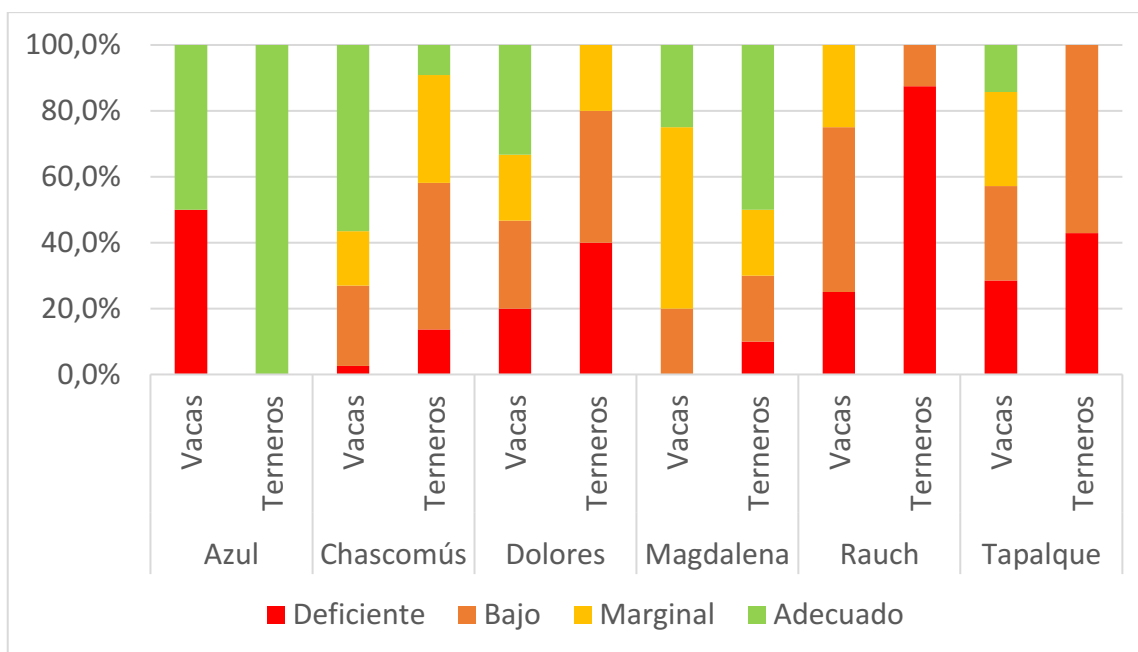
Figura 2.3. Actividad GPx en vacas y terneros de diferentes partidos de la CDS.



La actividad GPx en sangre entera se determinó según el método de Paglia y Valentine (1967). Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM. ^{a, b} Barras con letras diferentes dentro de cada partido indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Valor adecuado: $> 39,4$ U/ml Hto.

En la Figura 2.4 se observa la distribución porcentual de los animales (vacas y terneros de los diferentes partidos) según su estatus de Se, determinado a partir de la actividad GPx en sangre entera. El porcentaje de animales con estatus adecuado de Se varía según los partidos, siendo mayor en el partido de Azul (66,67%) en comparación con los partidos de Chascomús (32%), Dolores (21,1%), Magdalena (30%), Rauch (0%) y Tapalqué (7,1%; $P < 0,01$). Con respecto a la categoría animal, se observó un mayor porcentaje de vacas con estatus adecuado de Se en relación con los terneros (35% vs 24%, respectivamente; OR = 1,63, Intervalo de confianza 95% = 0,97 - 2,71; $P = 0,05$).

Figura 2.4. Distribución porcentual de los animales según su estatus de Se en los diferentes partidos de la CDS.



El estatus de Se de los animales se midió a través de la determinación de la actividad GPx en sangre entera según el método de Paglia y Valentine (1967). Los datos están expresados como porcentajes de animales según los estatus deficiente, bajo, marginal y adecuado (< 18, 18,5 – 30,3, 30,3 – 39,4 y > 39,4 U/ml Hto, respectivamente), según la categoría animal y el partido de la CDS.

Asociación entre la actividad GPx en bovinos y la estación del año.

La actividad GPx de los animales muestreados en el partido de Chascomús a lo largo de las 4 estaciones se detallan en la Tabla 2.2. El nivel de actividad GPx de los animales no fue diferente según la estación del año ($P > 0,05$; Tabla 2.2). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas según la categoría animal y el establecimiento muestreado ($P < 0,01$; Tabla 2.2). Además, se observó una interacción categoría*establecimiento sobre la actividad GPx, que demuestra una mayor actividad enzimática para las vacas en relación a

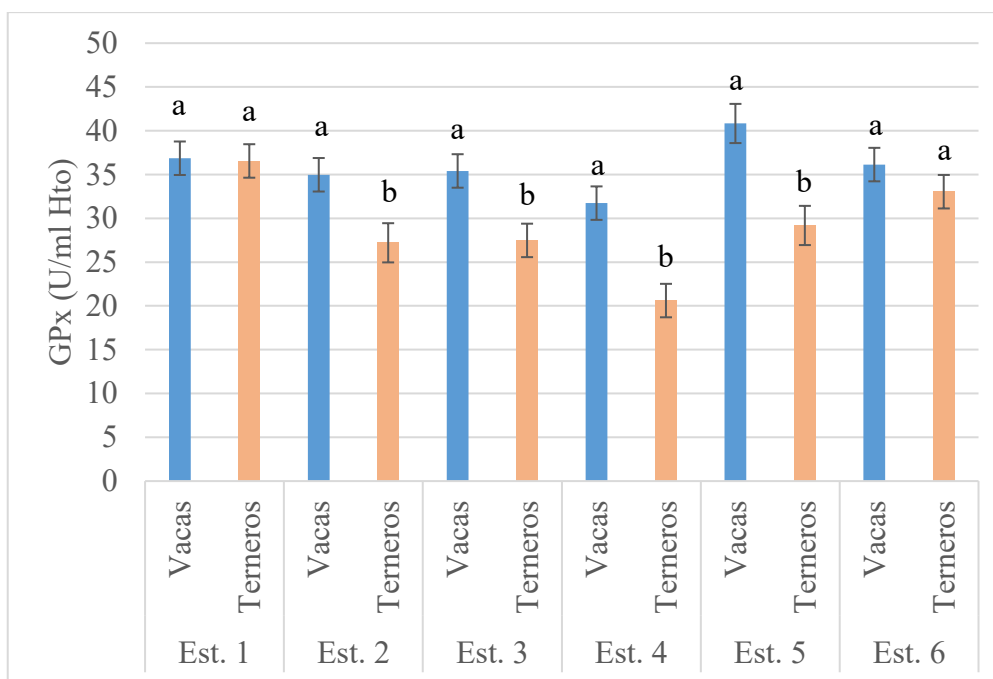
los terneros en 4 de los establecimientos muestreados ($P < 0,01$), mientras que, en 2 de ellos la actividad GPx fue similar para ambas categorías ($P > 0,05$; Figura 2.5).

Tabla 2.2. Actividad GPx en sangre entera según la estación del año, la categoría animal y el establecimiento dentro del partido de Chascomús.

Variable	Actividad GPx (U/ml Hto)	EEM	Valor de P
Estación del año			
Otoño	32,54	1,32	0,8
Invierno	31,54	1,10	
Primavera	33,27	1,10	
Verano	32,64	1,10	
Categoría			
Vacas	35,99 ^a	0,80	< 0,01
Terneros	29,01 ^b	0,83	
Establecimiento			
1	36,70 ^a	1,35	<0,01
2	31,09 ^b	1,47	
3	31,44 ^b	1,35	
4	26,17 ^c	1,35	
5	35,00 ^a	1,60	
6	34,58 ^a	1,35	

La actividad GPx en sangre entera se determinó según el método de Paglia y Valentine (1967). Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados. ^{a-c} Valores con diferente superíndice dentro de cada columna indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). GPx: glutatión peroxidasa; U/ml Hto: unidades/ mililitro de hematocrito; EEM: Error estándar de la media. Valor adecuado: $> 39,4$ U/ml Hto.

Figura 2.5. Actividad GPx en vacas y terneros de diferentes establecimientos del partido de Chascomús.

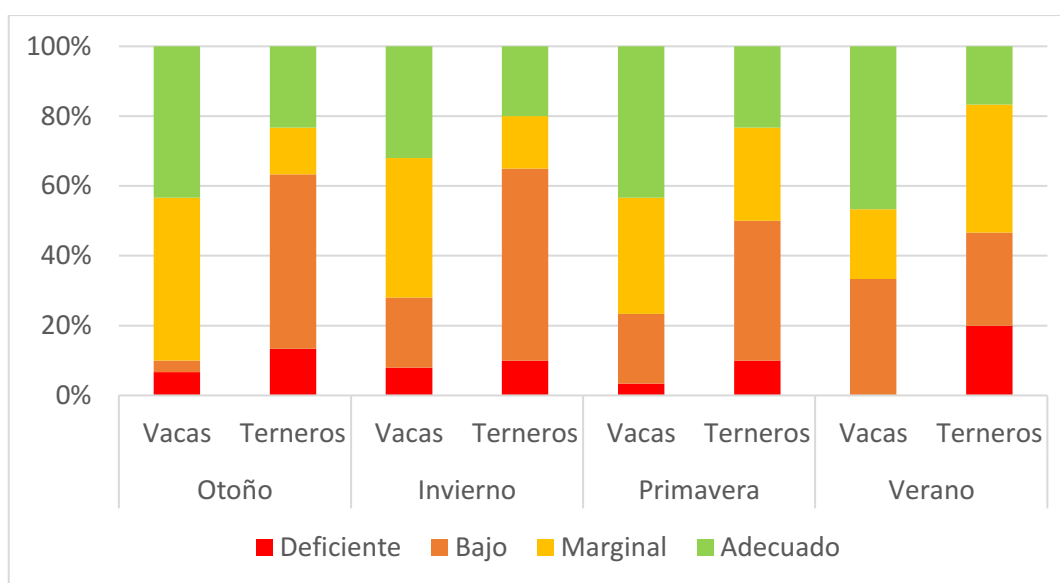


La actividad GPx en sangre entera se determinó según el método de Paglia y Valentine (1967). Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM. ^{a, b} Barras con letras diferentes dentro de cada establecimiento indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Valor adecuado: $> 39,4$ U/ml Hto.

En la figura 2.6 se observa la distribución porcentual del estatus de Se en vacas y terneros del partido de Chascomús para las diferentes estaciones del año. El porcentaje de animales con estatus adecuado de Se fue mayor en vacas que en terneros (42% vs. 21%, respectivamente, OR = 3,34, Intervalo de confianza 95% = 1,66 - 6,72; $P < 0,01$). Por otro lado, ese porcentaje fue diferente según el establecimiento muestreado ($P < 0,05$). Los establecimientos 1 y 6 tuvieron porcentajes similares (47,5% y 50%, respectivamente; $P > 0,05$), y mayores que los establecimientos 2, 3, 4 y 5 ($P < 0,05$), los cuales presentaron porcentajes similares entre si (28,6 %, 20 %, 20% y 20% respectivamente; $P > 0,05$). Los

establecimientos 1 y 2 tendieron a ser diferentes ($P < 0,1$). El porcentaje de animales con estatus adecuado fue similar en las 4 estaciones del año ($P > 0,05$), y no se encontró efecto de las interacciones analizadas (categoría*establecimiento: $P > 0,10$; categoría*estación: $P > 0,10$; establecimiento*estación: $P > 0,10$; categoría*establecimiento*estación: $> 0,10$).

Figura 2.6. Distribución porcentual del estatus de Se por rangos, en vacas y terneros del partido de Chascomús según la estación del año.



El estatus de Se de los animales se midió a través de la determinación de la actividad GPx en sangre entera según el método de Paglia y Valentine (1967). Los datos están expresados como porcentajes de animales según los estatus deficiente, bajo, marginal y adecuado (< 18 , $18,5 - 30,3$, $30,3 - 39,4$ y $> 39,4$ U/ml Hto, respectivamente) según la categoría animal y la estación del año.

DISCUSIÓN

A pesar de que en la CDS se ha reportado la manifestación clínica de la deficiencia de Se en bovinos (Rodríguez y col., 2016), no existen reportes de deficiencia subclínica en la zona. Nuestros resultados demuestran que más del 50% de los animales de las zonas

muestreadas presentaban niveles de actividad GPx compatible con algún grado de deficiencia de Se.

La hembra bovina transfiere Se al feto a través de la placenta durante el último tercio de la gestación, y luego del nacimiento a través del calostro y la leche (Van Saun y col., 1989; Ceballos y Wittwer, 1996; Mehdi y Dufrasne, 2016). Sin embargo, esta última es menos eficiente para mantener un adecuado estatus de Se en los terneros lactantes, aumentando el riesgo de carencia en los animales jóvenes. Según Herdt y Hoff (2011), los niveles de Se en animales jóvenes permanecen bajos, debido a las bajas concentraciones de Se en la leche durante el amamantamiento, y aumentarían una vez que los terneros comienzan a ingerir alimentos sólidos. Diversos autores han reportado diferencias en el estatus de Se según la categoría animal estudiada (Pavlata y col., 2002; Wittwer y col., 2002; Minatel y col., 2004). Si bien nuestros resultados no reflejan diferencias en la actividad GPx entre vacas y terneros en la CDS, cuando analizamos el porcentaje de animales con estatus adecuado, este es mayor en vacas que en terneros. Este mismo comportamiento se vio cuando analizamos el porcentaje de animales con estatus adecuado en el partido de Chascomús a lo largo de las cuatro estaciones. Además, en este caso, la actividad GPx también fue mayor en las vacas. Esta diferencia entre la CDS y el estudio hecho en Chascomús podrían deberse a que, si bien el criterio para la división de los animales en las dos categorías fue similar, la edad promedio de los terneros en el partido de Chascomús fue menor que en aquellos de la CDS. El seguimiento de los animales del partido de Chascomús para las 4 estaciones del año culminó con animales jóvenes, con un rango de edad entre los 8 y 12 meses, incluyendo en su gran mayoría animales en el período de lactancia, mientras que en el relevamiento de la CDS la edad de los terneros tuvo una distribución más amplia dentro del rango de edad establecido.

Cabe destacar que, tanto en el relevamiento de los diferentes partidos de la CDS como en el estudio del partido de Chascomús en particular, se encontró efecto de la ubicación de los animales (partidos y establecimientos, respectivamente) sobre la actividad GPx y el porcentaje de animales con estatus adecuado de Se. Herdt y Hoff (2011), analizando las muestras de 1585 animales de 165 rodeos, destacan que la variación en el estatus de Se entre diferentes rodeos es relativamente alta, mientras que la variación dentro de un mismo rodeo es relativamente baja, comparado con otros minerales traza como el cobre o el zinc. Según estos autores, el efecto relativo del rodeo sobre el estatus de Se sería influenciado por la ubicación de los animales muestreados, las prácticas de manejo, y la nutrición de los mismos, entre otros factores (Herdt y Hoff, 2011). En este sentido, nuestros resultados demuestran que, a pesar de que todos los animales muestreados se encontraban sobre sistemas pastoriles extensivos y sin suplementación mineral, el porcentaje de animales con estatus adecuado de Se fue variable entre los partidos muestreados, y a su vez entre los establecimientos de un mismo partido. Por otro lado, es interesante destacar que si bien la media de actividad GPx para los partidos de Azul y Magdalena ubica a los animales dentro del rango de estatus adecuado de Se (los únicos dos de todos los partidos muestreados), si tenemos en cuenta los animales que conforman la muestra de manera aislada, el porcentaje de animales con estatus adecuado en el partido de Azul es de 66,67%, mientras que en el partido de Magdalena es de solo el 30%. Esto quiere decir que, aun en rodeos donde el estatus determinado por la media de actividad GPx de los animales muestreados es considerado como adecuado, existe la posibilidad de subestimar la existencia de la carencia, como se refleja en el partido de Magdalena donde el 70% de los animales tuvieron algún grado de deficiencia.

Finalmente, la bibliografía internacional señala la época estival como el momento más propenso para la presentación de la deficiencia de Se (Allen y col., 1975; Van De Weyer

y col., 2010). En Argentina, Buffarini y col. (2007; 2008) reportaron resultados similares en dos rodeos al oeste de la Provincia de Buenos Aires, donde los valores más bajos de actividad GPx se registraron durante el verano, y los valores más altos durante el otoño e invierno. Contrariamente, en los resultados obtenidos en el partido de Chascomús no encontramos efecto de la estación del año sobre la actividad GPx. En este sentido, Cseh y col. (2013) reportaron que la actividad GPx fue similar a lo largo de las diferentes estaciones del año, no solo en animales del oeste de la Provincia de Buenos Aires, sino también en provincias del norte y del sur del país. Esta diferencia en el comportamiento de la actividad GPx observada por nosotros y otros autores posiblemente refuerce el concepto de variabilidad debido a la ubicación de los animales muestreados, descripto por Herdt y Hoff (2011).

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados del relevamiento de los partidos de la CDS demuestran que más del 50% de los animales muestreados presentan algún grado de deficiencia. Además, tanto el relevamiento de la CDS como el estudio del partido de Chascomús demuestran que los terneros tendrían una mayor susceptibilidad a sufrir la deficiencia de Se. Por otro lado, no se encontró efecto de la estación del año sobre la actividad GPx o el porcentaje de animales con estatus adecuado de Se. Por último, se observó una gran variabilidad en la actividad GPx y el estatus de Se de los animales, no solo entre los partidos muestreados, sino también entre los establecimientos de un mismo partido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen WM, Bradley R, Berret S, Parr WH, Swannack K, Barton CRQ, Macphee A. Degenerative myopathy with myoglobinuria in yearling cattle. *Br. Vet. J.* 1975; (131):292-308.
2. Alloway BJ. 2012. Heavy Metals in Soils: Trace Elements and Metalloids in Soils and their Bioavailability. 3 ed. Dordrecht: Springer.
3. Ammerman CB, Miller SM. Selenium in ruminant nutrition: a review. *J Dairy Sci.* 1975; 58 (10):1561-1577.
4. Barbagallo J. Las áreas anegables de la Pampa Deprimida. Un planteo agrohidrológico para su solución. Coloquio Intern. De Grandes Llanuras. Unesco. VIII, 789-827. 1983. Olavarría. Provincia de Buenos Aires.
5. Buffarini MA, Minatel L, Cseh S. Variación estacional de minerales en sangre en dos rodeos de cría en el Partido de General Villegas. Memoria Técnica INTA 2007-2008; 88-92.
6. Campbell JR, Jim GK, Booker CW, Guichon PT. A survey of the selenium status of beef cows in Alberta. *Can Vet J.* 1995; 36.
7. Ceballos A, Wittwer F. Metabolismo del selenio en ruminantes. *Arch. Med. Vet.* 1996; 28:5-18.
8. Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Quiroz E, Böhmwal HL. Actividad de Glutación Peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de Selenio. *Pesq. agropec. bras.* 1999; 34 (12):2331-2338.
9. Cseh S, Drake M, Brambilla E. Deficiencia de selenio en bovinos según época del

- año y región en Argentina. *Revista de Producción Animal*. 2013; 33 (1):21.
10. Enjalbert F, Lebreton P, Salat O. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2006; 90(11-12):459-466.
 11. Fordyce FM. 2013. Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. Essentials of Medical Geology. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-4375-5_16.
 12. Hefnawy AEG, Tórtora-Pérez JL. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Res*. 2010; 89 (2–3):185-192. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.12.042.
 13. Herdt TH, Hoff B. The use of blood analysis to evaluate trace mineral status in ruminant livestock. *Vet Clin Food Anim*. 2011; 27:255-283. doi:10.1016/j.cvfa.2011.02.004.
 14. Jones GD, Droz B, Greve P, Gottschalk P, Poffet D, McGrath SP, Seneviratne SI, Smith P, Winkel LHE. Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2017; 114: 2848-2853. doi:10.1073/pnas.1611576114.
 15. Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales E, Bertin G. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J. Anim. Sci*. 2008; 86:3100-09.
 16. Kegley EB, Ball JJ, Beck PA. Impact of mineral and vitamin status on beef cattle immune function and health. *J. Anim Sci*. 2016; 94(12):5401-13.
 17. Koller LD, South PJ, Exon JH, Whitbeck GA. Selenium deficiency of beef cattle in Idaho and Washington and a practical means of prevention. *Cornell Vet*. 1983; 73(4):323-32.

18. Larson CK. Role of trace minerals in animal production. Nutrition Conference sponsored by Department of Animal Science, UT Extension and University Professional and Personal Development The University of Tennessee. 2005. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/94f6/2d58d563de87cc1e99ab920fbffd7b311447.pdf>.
19. Li Z, Liang D, Peng Q, Cui Z, Huang J, Lin Z. Interaction between selenium and soil organic matter and its impact on soil selenium bioavailability: A review. *Geoderma*. 2017; 295:69–79. doi: 10.1016/j.geoderma.2017.02.019.
20. Maas J. Deficiencia de Se en el ganado bovino. En: XVI Congreso Mundial de Buiatría. Salvador, Bahía, Brasil. 1990; 3-13.
21. Mehdi Y, Dufrasne I. Selenium in Cattle: A Review. *Molecules*. 2016; 21(4):545. doi:10.3390/molecules21040545.
22. Micheloud JF, Araoz V, Delgado FO, Colque-Caro LA, Rosa DE, Mattioli GA. Distrofia muscular nutricional en corderos de raza Dorper en el Noroeste Argentino. *Rev. med. vet.* 2018; 99(2):13-16.
23. Minatel L, Buffarini MA, Scarlata EF, Dallorso ME, Carfagnini JC. Nivles de Cobre, Hierro, Zinc y Selenio en bovinos del noroeste de la Provincia de Buenos Aires. *Rev. Arg. prod. Anim.* 2004; 24 (3-4):225-35.
24. Miretzky, PS. Procesos geoquímicos en la cuenca baja del Río Salado, Provincia de Buenos Aires [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3395_Miretzky.pdf.
25. National Research Council. Nutrient requirements of beef cattle. 8 ed update 2016. The National Academies Press, Washington, DC.

26. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characteristics of erythrocyte peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70:158–169.
27. Pavlata L, Illek J, Pechová A, Matújíšek. Selenium Status of Cattle in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno.* 2002, 71:3-8.
28. Randox Laboratories. Technical brief. Crumlin, United Kingdom. 2009.
29. Rodriguez AM, Romero RA, Odriozola ER, Garcia JA, Brambilla EC, Armendano JI, Canton GJ. Enfermedad del músculo blanco en terneros para cría en Provincia de Buenos Aires. X Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE). Santa Fe, del 24 al 26 de agosto 2016.
30. Sánchez RO, Ferrer JA, Duymovich OA, Hurtado MA. Estudio pedológico integral de los partidos de Magdalena y Brandsen (provincia de Buenos Aires). *LEMIT, anales.* 1976. Serie II, N° 310.
31. Senasa. Estadísticas ganaderas. [Consulta diciembre 2017]. Disponible en <http://senasa.gob.ar/información/informes-y-estadísticas/movimientos>.
32. Sharma VK, Mc Donald TJ, Sohn M, Anquandah GAK, Pettine M, Zboril R. Biogeochemistry of selenium. A review. *Environ Chem Lett.* 2015; 13:49-58. doi:10.1007/s10311-014-0487-x.
33. Spears JW, Harvey RW, Segerson EC. Effects of marginal selenium deficiency and winter protein supplementation on growth, reproduction and selenium status of beef cattle. *J. Anim Sci.* 1986; 63(2):586-94.
34. Spears JW. Micronutrients and immune function in cattle. *Proc Nutr Soc.* 2000; 59(4):587-94. doi: 10.1017/s0029665100000835.

35. Suttle NF. 2010. Mineral Nutrition of Livestock, 4 ed. Pp 377–425. Oxfordshire, Reino Unido. doi:10.1079/9781845934729.0255.
36. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(3-4):134-44.
37. Van De Weyer LM, Hendrick S, Waldner CL. Serum micronutrient concentrations in beef cows before and after the summer grazing season. *Can. J. Anim. Sci.* 2010; 90:563-74. doi:10.4141/CJAS10036.
38. Van Saun RJ, Herdt TH, Stowe HD. Maternal and fetal selenium concentrations and their interrelationships in dairy cattle. *J Nutr.* 1989; 119(8):1128-37.
39. Vázquez PM, Cabria FN, Rojas MC, Calandroni MB. Riesgo de anegamiento: estimaciones para la Cuenca Baja del Río Salado. *Cienc. suelo* [online]. 2009; 27:237-246.
40. Waldner CL, Van De Weyer LM. Selenium status at the end of the grazing season, reproductive performance and degenerative myopathy in beef herds. *Can Vet J.* 2011; 52(10):1083-8.
41. Wittwer F, Araneda P, Ceballos A, Contreras PA, Andaur M, Böhmwald H. Glutathion peroxidase activity (GSH-Px) in grazing dairy cattle in the south of Chile (IXth Region) and their relation with selenium contents in the forage. *Arch. med. vet.* 2002; 34:1.

CAPÍTULO III

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PARENTERAL CON SELENIO SOBRE LA GANANCIA DE PESO Y LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA EN TERNEROS EN PREDESTETE Y EN UN SISTEMA DE CONFINAMIENTO.

INTRODUCCIÓN

El sistema tradicional de producción de bovinos para carne está dividido en dos etapas principales. La primera es la etapa de cría, que se extiende desde el nacimiento de los terneros hasta su destete y es principalmente realizada sobre sistemas pastoriles extensivos. La segunda, el engorde, se extiende desde el destete hasta la faena, pudiendo realizarse en un sistema a base de pastizales naturales complementado con pasturas implantadas o en un sistema de confinamiento en corrales con el suplemento de granos. Según Vittone y col. (2015), en nuestro país aproximadamente un 70% de los animales jóvenes que llegan a faena atraviesan por un período de confinamiento con suplementación con granos.

Una de las principales zonas ganaderas de Argentina es la CDS. Con aproximadamente 5,5 millones de bovinos (SENASA, 2017), es la mayor zona productora de terneros del país. La actividad ganadera se realiza principalmente a base de pastizales naturales y pasturas naturalizadas como principal fuente de alimento (Némoz, 2013). Este tipo de sistema pastoril es propenso a generar carencias minerales, entre ellas la de Se (Suttle, 2010).

El Se aportado por el alimento es absorbido por vía intestinal, metabolizado en el hígado y distribuido en el organismo para ser incorporado en la síntesis de selenoenzimas

(Burk y Hill, 2015; Mehdi y Dufrasne, 2016). Durante el último tercio de la gestación la hembra bovina transfiere Se al feto a través de la placenta, y posterior al nacimiento a través del calostro y la leche (Van Saun y col., 1989; Ceballos y Wittwer, 1996; Mehdi y Dufrasne, 2016). Esta última es menos eficiente para mantener un estatus de Se adecuado en los terneros lactantes, pudiendo llegar a la etapa de destete en condiciones de deficiencia (Enjalbert y col., 1999).

El rol del Se en la salud animal está íntimamente ligado a la función de las selenoproteínas, muchas de las cuales tienen actividad antioxidante (Fairweather-Tait y col., 2010). Entre ellas, las enzimas GPx se encargan de neutralizar las especies reactivas del oxígeno (EROs), particularmente el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua, evitando que genere daño oxidativo (Rotruck y col., 1973; Jozefczak y col., 2012). Las EROs son generadas como consecuencia de la actividad metabólica normal del organismo, y su producción se eleva en situaciones de estrés, de la misma manera que aumenta la demanda de las defensas antioxidantes para neutralizarlos, incluida la actividad GPx (Miller y col., 1993; Finch y Turner, 1996; Puppel y col., 2015).

La actividad GPx en sangre entera está directamente relacionada con el aporte dietario de Se. Debido a que existe una elevada correlación entre dicha actividad enzimática y la concentración de Se en hígado y sangre, se la considera un fiel indicador para evaluar el estatus de este mineral en los rodeos bovinos (Ceballos y col., 1999; Tapiero y col., 2003, Juniper y col., 2008). Niveles de actividad GPx en sangre menores a 39,4 U/ml Hto son indicativos de carencia (Mass, 1990; Ceballos y Wittwer, 1996). En este sentido, Argentina posee antecedentes de bajos niveles de actividad GPx en sangre (Minatel y col., 2004; Cseh y col., 2013; Brambilla y col., 2016), al igual que bajas concentraciones de Se en forrajes (Ruksan, 1998; Gil y col., 2004; Brambilla y col., 2016), así como también casos clínicos de

EMB, forma clínica de la carencia de Se en terneros (Duffy y col., 1986; Rodriguez y col., 2016). Lamentablemente, la forma subclínica de esta carencia mineral precede a la EMB y puede pasar desapercibida, generando pérdidas productivas importantes (Larson, 2005; Enjalbert y col., 2006; Kegley y col., 2016). Es así como terneros con una disminución de la actividad GPx en sangre y la consecuente disminución en la capacidad antioxidante pueden generar menores tasas de crecimiento (Spears y col., 1986; Asres y Amha, 2014).

Los sistemas extensivos y pastoriles de cría son propensos a generar carencias minerales, principalmente debido a la existencia de suelos, y por ende forrajes, con baja concentración del elemento, o condiciones y manejos del suelo que impiden la incorporación del mineral por parte de los forrajes (Kubota y col., 1967; Ammerman y Miller, 1975; Mac Donald y col., 1976; Fishbein, 1983). Sin embargo, aunque las deficiencias minerales generan un menor crecimiento, el estatus mineral de los animales al final del período de cría es poco conocido (Ward and Spears, 1997; Spears and Kegley, 2002; Genther, 2014). Por otro lado, el período de transición entre el sistema de cría y el ingreso al sistema de engorde en confinamiento representa un desafío estresante para los animales (Chirase y col., 2004; Eitam y col., 2010; Enriquez y col., 2011; Hall y col., 2012). Durante las primeras semanas en el nuevo sistema, los animales deben adaptarse a las nuevas condiciones productivas (Loerch y Fluharty 1999; Bevans y col., 2005). En este período de adaptación, generalmente considerado de 3 a 4 semanas de duración, se superponen cambios sociales, ambientales y de alimentación, que llevan indefectiblemente a una reducción en el consumo de alimento, evitando así que se cubran los requerimientos nutricionales, incluido el de Se (Loerch y Fluharty 1999; NRC, 2000; Noffsinger y col., 2015). A su vez, las reducciones en el consumo de alimento en esta etapa se relacionan con una menor conversión alimenticia (Finch y Turner, 1996; Bottje y col., 2009; Galyean y col., 2011).

En consecuencia, teniendo en cuenta que los sistemas pastoriles extensivos de cría implican un riesgo potencial de carencia de Se, y el estrés que representa para los animales el destete e ingreso a un nuevo sistema productivo, se diseñaron dos experimentos con el fin de evaluar el efecto de la suplementación parenteral con Se sobre la ganancia diaria de peso (GDP) y los niveles de actividad GPx en sangre entera en: a) terneros de cría de la CDS al pie de sus madres, y b) en terneros durante el período de adaptación a un sistema de engorde en confinamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Protocolo número 51-3-15T).

Animales, establecimientos y sistemas productivos

Evaluación de la suplementación con Se en un sistema de cría

El experimento 1 se llevó a cabo en un establecimiento comercial dedicado a la cría bovina situado en el partido de Chascomús (35° 44' 31.5" S 58° 06' 11.7" W), Provincia de Buenos Aires. Para este ensayo se utilizaron 46 terneros machos castrados de la raza Aberdeen Angus, con un peso al inicio del ensayo de 117,04 kg \pm 21,92 kg, y 99 \pm 18,5 días de vida. Al inicio del experimento los animales estaban identificados con doble caravana y contaban con una dosis de vacuna clostridial (Policlostrigen® Biogénesis-Bagó) y desparasitación (Ricobendazol - Paraxane® Inyectable Biogénesis-Bagó). La carga de

parásitos gastrointestinales fue vigilada mediante análisis coproparasitológicos y no superó el conteo de 50 huevos por gramo (HPG) de materia fecal a lo largo del experimento.

Los terneros se mantuvieron al pie de sus madres durante todo el experimento rotando sobre parcelas compuestas por pastizales naturales y naturalizados (*Chaetotropis elonga*, *Stenotaphrum secundatum*, *Paspalum dilatatum*, *Lolium perenne*, *Lotus tenuis*), sin suplementación mineral complementaria. Al inicio del experimento (día 0) se dividieron al azar en 2 grupos. Un grupo fue suplementado con selenito de sodio (0,1 mg de Se/kg de peso vivo; grupo Se), mientras que el otro grupo recibió el mismo volumen de solución fisiológica estéril (Cloruro de Sodio 0,9%; grupo CON), ambos por vía subcutánea (SC).

Los animales fueron sangrados por venopunción yugular y pesados en forma individual al inicio del experimento (día 0) y en los días 28, 59, 90 y 119. La GDP se calculó para los intervalos de tiempo 0 a 28; 28 a 59; 59 a 90; y 90 a 119 a partir del cociente entre la diferencia del peso al inicio y al final de cada intervalo de tiempo y el número de días de duración de cada uno. La suplementación parenteral se realizó los días 0, 28, 59 y 90, siempre luego del sangrado y del registro del peso.

Dos animales del grupo CON y un animal del grupo Se desarrollaron problemas umbilicales, no relacionados con el tratamiento, y sus datos fueron excluidos del estudio.

Evaluación de la suplementación con Se en un sistema de engorde en confinamiento

El experimento 2 se llevó a cabo en un establecimiento comercial, ubicado en la localidad de Marcos Paz (-34°08'S, -58°08'W), Provincia de Buenos Aires. Para este propósito, se utilizaron 60 terneros machos castrados de la raza Aberdeen Angus provenientes del Partido de Dolores, Provincia de Buenos Aires. Los animales fueron

destetados precozmente (edad promedio de 4 meses), los cuales se encontraban clínicamente sanos y con un peso corporal de $83,8 \pm 12$ kg al inicio del experimento. El día del arribo al establecimiento los animales fueron alojados en corrales de recepción con acceso a heno de pastura y agua ad-libitum, cumpliendo con un período de hidratación y descanso de 72 h. Posteriormente se identificaron con doble caravana y se realizó el programa sanitario, que incluyó una dosis de vacuna clostridial (Policlostrigen® Biogénesis-Bagó), antibiótico inyectable de amplio espectro (Tilmicosina - Maxityl® Biogénesis-Bagó), desparasitación (Ricobendazol - Paraxane® Inyectable Biogénesis-Bagó). La carga de parásitos gastrointestinales fue vigilada mediante análisis coproparasitológicos y no superó el conteo de 50 HPG de materia fecal al día 21 del experimento.

Previo al ingreso a los corrales de alimentación (día 0) los animales fueron asignados al azar a uno de los dos tratamientos, alcanzando un número final de 30 animales por grupo (n=30). En ese momento y 7 días después (día 7) los animales del grupo suplementado (grupo Se) recibieron una dosis de selenito de sodio (0,1 mg de Se/Kg de peso vivo), mientras que el grupo control (grupo CON) recibió el mismo volumen de solución fisiológica estéril (Cloruro de Sodio 0,9%), ambos por vía SC.

Los animales fueron sangrados por venopunción yugular y pesados en forma individual al inicio del experimento (día 0) y al día 21. La GDP se calculó a partir del cociente entre la diferencia de ambos pesos y el número de días del experimento.

Durante los 21 días de experimento los animales recibieron una dieta de adaptación compuesta por 49% de grano de maíz, 19,5% de silo de maíz, 19,5% de harina de soja, 9,5% de gluten feed y suplementada con un núcleo vitamínico-mineral suministrado al 2,5 % de la proporción de materia seca de la ración, a modo de cubrir completamente los requerimientos vitamínicos minerales.

Recolección de sangre y determinaciones de hematocrito y actividad GPx

Las muestras de sangre se tomaron por venopunción yugular utilizando una jeringa y aguja estériles por animal. Se recolectaron en tubos plásticos con heparina sódica como anticoagulante. Los tubos se mantuvieron refrigerados durante el muestreo y se trasladaron al laboratorio en recipientes térmicos con hielo. En el laboratorio se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 3 h del muestreo.

El porcentaje de hematocrito se determinó por centrifugación en capilar (microhematocrito), empleando una microcentrífuga Rolco CH 24 (5 minutos a 12000 rpm). La actividad GPx en sangre entera se evaluó mediante método colorimétrico utilizando el kit comercial RANSEL (Cat. Num. RS 504, Laboratorio Randox Ltd, Crumlin, Reino Unido) y un espectrómetro UV/VIS (Lambda 25 - Perking Elmer) según el método de Paglia y Valentine (1967). La enzima GPx cataliza la oxidación de GSH por el hidroperóxido de cumeno. En presencia de la enzima GR y NADPH, el GSSG es inmediatamente convertido en su forma reducida con la consecuente oxidación del NADPH a NADP⁺. Brevemente, se diluyeron 0,05 ml de sangre en 2 ml del diluyente suministrado por el kit. Luego 0,01 ml de sangre diluida y hemolizada fueron colocados en tubos de vidrio con 0,5 ml del reactivo conformado por 4 mmol/L de GSH, 0,5 U/l de GR y 0,34 mmol/l de NADPH y 0,02 ml de hidroperóxido de cumeno. Para el blanco se utilizaron 0,01 ml de agua destilada. La absorbancia inicial y la absorbancia luego de 2 minutos fueron medidas para las muestras y blancos a 340 nm en el espectrómetro. Los controles de calidad se realizaron utilizando RANSEL Control. La concentración de GPx se calculó como U/l del hemolizado = 8412 x ΔA a 340nm, donde ΔA = variación entre la absorbancia inicial y a los 2 min. Luego se

multiplicó por el factor de dilución (41) y se realizó el cociente para cada muestra por su valor de hematocrito. La actividad GPx fue finalmente expresada en U/ml Hto. La actividad de esta enzima, como biomarcador biológicamente activo del estatus mineral en los bovinos, define el estatus de los animales en deficiente, bajo, marginal y adecuado (< 18, 18,5 – 30,3, 30,3 – 39,4 y > 39,4 U/ml Hto, respectivamente; Maas, 1990; Ceballos y col., 1999; Tapiero y col., 2003; Juniper y col., 2008; Randox, 2009).

Diseño experimental

Efecto de la suplementación parenteral con Se en terneros en un sistema de cría

En este experimento se evaluó el efecto de la suplementación con Se sobre la GDP y los niveles de actividad GPx en sangre de terneros de cría de la CDS al pie de sus madres. Se utilizaron 46 terneros Aberdeen Angus castrados, al pie de sus madres. Al inicio del experimento (día 0) se dividieron al azar en 2 grupos (CON y Se), como se explicó anteriormente. Los animales fueron sangrados por venopunción yugular y pesados en forma individual en los días 0, 28, 59, 90 y 119. La suplementación parenteral se realizó los días 0, 28, 59 y 90. Los resultados están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM.

Efecto de la suplementación parenteral con Se en terneros en un sistema de confinamiento

En este experimento se evaluó el efecto de la suplementación con Se sobre la GDP y los niveles de actividad GPx en sangre de terneros durante el periodo de adaptación a un sistema de confinamiento (primeros 21 días). Para este propósito se utilizaron 60 terneros Aberdeen Angus castrados. Previo al ingreso a los corrales de alimentación los animales

fueron asignados al azar a uno de los dos tratamientos (CON y Se) como se explicó anteriormente. Los animales fueron sangrados por venopunción yugular y pesados en forma individual en los días 0 y 21. La suplementación parenteral se realizó los días 0 y 7 del experimento. Los resultados están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio. El modelo estadístico incluyó el efecto del tiempo (día), el tratamiento (CON vs. Se) y la interacción entre ambos (tiempo*tratamiento) como variables fijas y el animal como variable aleatoria. Las variables peso vivo, GDP y actividad GPx se analizaron con una regresión lineal con medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS 9.4, Institute, Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos). En el caso del sistema de cría, la variable días de vida y peso al inicio del ensayo se utilizaron como covariables del modelo para el análisis de peso vivo y GDP. Para analizar la variabilidad en la actividad GPx y en la GDP se utilizó una regresión lineal con el procedimiento MIXED de SAS. Las medias de los mínimos cuadrados y los errores estándar se obtuvieron a través de LSMEANS. Cuando el tratamiento o la interacción tiempo*tratamiento fueron significativas se utilizó PDIFF para ver diferencias dentro de los días del experimento. La significancia estadística se estableció en $P < 0,05$ y $P \leq 0,10$ para tendencia e interacciones.

RESULTADOS

Efecto de la suplementación con Se en terneros en un sistema de cría

En el experimento 1, se observó una interacción tiempo*tratamiento ($P = 0,05$) sobre el peso vivo de los animales para los días 90 y 119 del ensayo. Los animales del grupo Se fueron más pesados que aquellos del grupo CON a los 90 días del ensayo ($P < 0,05$; Tabla 3.1); mientras que hubo una tendencia del peso a ser mayor en los animales del grupo Se sobre aquellos del grupo CON para el día 119 ($P < 0,10$; Tabla 3.1). Con respecto a la GDP se observó una interacción tiempo*tratamiento ($P < 0,05$), debido a que los animales del Grupo Se tuvieron una mayor GDP que los animales del grupo CON en el período comprendido entre los días 59 a 90 ($P < 0,05$; Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre el peso vivo y la GDP en terneros de cría al pie de la madre.

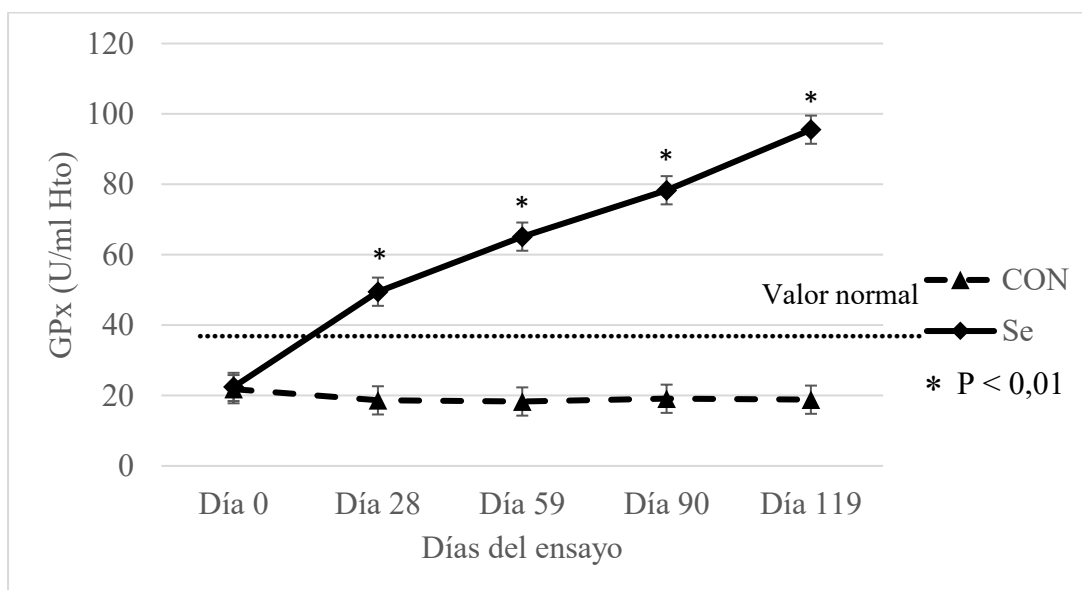
	Tratamientos		Valor de P		
	CON	Se	Tiempo	Tratamiento	Tiempo *
Peso vivo, kg					
Día 0	117,67 ($\pm 1,52$) ^a	117,71 ($\pm 1,67$) ^a			
Día 28	137,15 ($\pm 1,52$) ^a	138,61 ($\pm 1,67$) ^a			
Día 59	156,78 ($\pm 1,54$) ^a	157,66 ($\pm 1,67$) ^a	< 0,01	0,14	0,05
Día 90	175,15 ($\pm 1,54$) ^a	181,29 ($\pm 1,67$) ^b			
Día 119	198,92 ($\pm 1,54$) [*]	203,13 ($\pm 1,67$) [*]			
GDP, g/d					
Día 0 a 28	697,5 ($\pm 38,2$) ^a	747,4 ($\pm 42,1$) ^a			
Día 28 a 59	626,4 ($\pm 39,1$) ^a	615,7 ($\pm 42,1$) ^a	< 0,01	0,14	0,03
Día 59 a 90	591,3 ($\pm 39,1$) ^a	763,4 ($\pm 42,1$) ^b			
Día 90 a 119	818,9 ($\pm 39,1$) ^a	754,4 ($\pm 42,1$) ^a			

Los animales fueron suplementados con Se (0,1 mg/kg peso vivo; grupo Se) y con solución fisiológica estéril (CINa 0,9%; grupo CON) los días 0, 28, 59 y 90 del ensayo. Los animales fueron pesados en los días 0, 28, 59, 90 y 119. Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM. ^a

^b Valores con diferente superíndice dentro de cada fila indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Valores con (*) dentro de cada fila tendieron a ser diferentes ($P < 0,10$). GDP: Ganancia diaria de peso; CON: Grupo Control; SUP: Grupo Suplementado.

La actividad GPx se incrementó en los animales del grupo Se en los días 28, 59, 90 y 119, permaneciendo constante en los animales del grupo CON (tiempo: $P < 0,01$; tratamiento: $P < 0,01$; tiempo*tratamiento: $P < 0,01$; Figura 3.1).

Figura 3.1. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre la actividad GPx en sangre entera en terneros de cría al pie de la madre.



Los animales fueron suplementados con Se (0,1 mg/kg peso vivo; grupo Se) y con solución fisiológica estéril (ClNa 0,9%; grupo CON) los días 0, 28, 59 y 90 del ensayo. Los animales fueron sangrados en los días 0, 28, 59, 90 y 119. Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM (4,01 U/ml Hto). Valor Normal: 39,4 U/ml Hto; CON: Grupo Control; Se: Grupo Suplementado.

Efecto de la suplementación con Se en terneros en un sistema de engorde en confinamiento

En el experimento 2, existió una interacción tiempo*tratamiento ($P = 0,10$), según la cual el peso vivo de los animales del grupo Se fue mayor que el de los animales del grupo CON a los 21 días del ensayo (Tabla 3.2). Además, la GDP de los animales suplementados

con Se tendió a ser mayor que la de los animales que no recibieron la suplementación con el mineral ($P = 0,10$; Tabla 3.2).

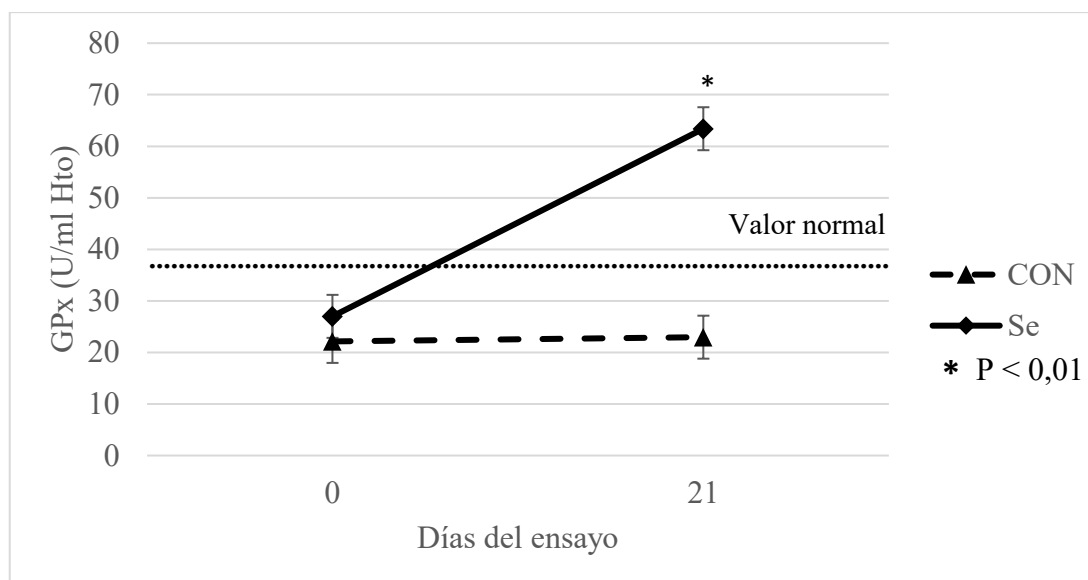
Tabla 3.2. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre el peso vivo y la GDP en terneros durante el período de adaptación.

	Tratamientos		Tiempo	Valor de P	
	CON	Se		Tratamiento	Tiempo *
Peso vivo, kg					
Día 0	81,07 ($\pm 1,35$)	83,16 ($\pm 1,32$)	< 0,01	0,08	0,10
Día 21	97,50 ($\pm 1,35$) ^a	101,65 ($\pm 1,32$) ^b			
GDP, g/d					
Día 0 a 21	782,2 ($\pm 40,5$) [*]	880,2 ($\pm 43,1$) [*]	-	0,10	-

Los animales fueron suplementados con Se (0,1 mg/kg peso vivo; grupo Se) y con solución fisiológica estéril (CINa 0,9%; grupo CON) los días 0 y 7 del ensayo. Los animales fueron pesados al día 0 y 21. Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM. Valores con (*) dentro de cada fila tendieron a ser diferentes ($P = 0,1$). GDP: Ganancia diaria de peso; CON: Grupo Control; Se: Grupo Suplementado.

La actividad GPx se incrementó a los 21 días del ensayo en los animales del grupo Se, permaneciendo constante en los animales del grupo CON (tiempo: $P < 0,01$; tratamiento: $P < 0,01$; tiempo*tratamiento: $P < 0,01$; Figura 3.2).

Figura 3.2. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre la actividad GPx en sangre entera en terneros durante el período de adaptación al confinamiento.



Los animales fueron suplementados con Se (0,1 mg/kg peso vivo; grupo Se) y con solución fisiológica estéril (ClNa 0,9%; grupo CON) los días 0 y 7 del ensayo. Los animales fueron sangrados al día 0 y 21. Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM (4,1 U/ml Hto). Valor normal: 39,4 U/ml Hto; CON: Grupo Control; Se: Grupo Suplementado.

DISCUSIÓN

La suplementación con Se en bovinos ha sido evaluada en diferentes dosis y vías de suplementación, e incluso combinada con otros elementos y sustancias arrojando resultados variados. Esta variación en la respuesta puede deberse a varios factores, como el estatus de los animales al momento de la administración, la vía, frecuencia y dosis de aplicación, como también los antecedentes de carencia en los rodeos evaluados. Castellan y col. (1999) evaluaron la GDP de terneros de cría en respuesta a la suplementación con Se y la suplementación proteica de las madres. Estos autores, encontraron mayores GDP en terneros de cría cuando fueron suplementados con 4 aplicaciones SC de Se (0,05 mg/kg) como selenito de sodio, asociado a la suplementación proteica de sus madres, mientras que en

aquellos terneros que recibieron una sola aplicación de Se o sus madres no tuvieron suplementación proteica, la GDP fue similar a la del grupo control. Contrariamente, nuestros resultados demostraron un efecto beneficioso del selenito sobre la GDP aún en terneros cuyas madres no recibieron suplementación proteica. La diferencia podría deberse a la dosis utilizada, ya que Castellan y col. (1999) emplearon la mitad de la concentración de Se empleada en nuestro ensayo. En 1986, Spears y col. (1986) incrementaron el peso al destete suplementando en forma SC selenito de sodio asociado con vitamina E (0,05 mg y 0,75 UI/kg, respectivamente). Por otro lado, en animales en confinamiento y con una dieta deficiente en Se, Reffett y col. (1986) demostraron que una única aplicación de selenito de sodio (0,07 mg/kg de peso) por vía intramuscular tendía a aumentar la GDP. Además, estos autores informan una mayor GDP en aquellos animales con menores valores de actividad GPx al momento de la suplementación. En concordancia con lo descrito por estos autores, en nuestro ensayo la suplementación con selenito de sodio en animales en la etapa de engorde en confinamiento tendió a aumentar la GDP, aun cuando la dieta no era deficiente en Se y la vía de administración fue SC. Los efectos beneficiosos del Se también han sido demostrados con la suplementación oral (Perry y col., 1976; Wichtel y col., 1996; Hall y col., 2012; Hall y col., 2013).

Con respecto al aumento del peso vivo, diversos autores no han encontrado un efecto beneficioso al suplementar con Se. La suplementación parenteral con selenito de sodio no incrementó el peso en vacas y terneros suplementados por vía SC (20 mg/animal; Hidiroglou y Jekins, 1975), en novillitos de ingreso a confinamiento suplementados por vía IM (25 mg/animal; Droke y col., 1989) ni en novillitos suplementados por vía SC (0,05 mg/kg; Swecker y col., 2008). Por otro lado, el peso tampoco se vio incrementado con la suplementación oral en vacas y terneros (26 mg Se/kg en forma de selenito de sodio o seleno-

levaduras; Gunter y col., 2003) o en vaquillonas (3 mg/animal/día de selenito de sodio o seleno-levaduras combinados; Chorfi y col., 2011).

La deficiencia de Se, demostrada por los bajos niveles de actividad GPx en sangre entera al inicio de los experimentos (< 22 y 27 U/ml Hto, para el sistema de cría y el sistema de confinamiento, respectivamente), coinciden con antecedentes en la Provincia de Buenos Aires (Minatel y col., 2004; Cseh y col., 2013). La suplementación parenteral con Se en ambos experimentos elevó la actividad GPx en sangre entera, desde niveles de deficiencia hasta valores de normalidad (> 39,4 U/ml Hto) a los 28 días en animales de cría y a los 21 días en animales en confinamiento. Esto coincide con el lapso de 1 a 4 semanas informado como necesario para elevar su actividad (Levander 1986; McDowell 1992), tanto en suero (Thompson y col., 1981) o plasma (Chorfi y col., 2011), como en sangre entera (Reffett y col., 1986). Estos resultados indican que la dosis y la vía de suplementación utilizada fueron adecuadas para corregir la deficiencia por al menos 28 y 21 días en los sistemas productivos evaluados. En contrapartida, los niveles de GPx en el grupo CON de ambos experimentos se mantuvieron dentro del rango considerado como deficiente durante todo el periodo evaluado. Aunque los niveles de Se del forraje y la leche no fueron determinados, los bajos niveles de GPx en el grupo CON sugieren que el aporte de Se en estos alimentos no fue suficiente para cubrir los requerimientos de los animales durante el período de cría (Ruksan, 1998; Enjalbert y col., 1999; Gil y col., 2004; Mehdi y Dufrasne, 2016). Por otro lado, llama la atención que el estatus del grupo CON de los animales en confinamiento se mantuviera como deficiente, siendo que el aporte de Se del suplemento mineral de la dieta garantizaba cubrir el 100% de los requerimientos (0,12 ppm Se/kg MS); incluso sin considerar el Se aportado por el alimento. Esto podría deberse al menos a dos factores, una reducción en el consumo de alimento debido al estrés que provoca la adaptación a un nuevo sistema, o bien, que el retardo

que posee la vía oral para elevar la actividad GPx supere los 21 días. Se ha demostrado que el estrés propio del ingreso al confinamiento reduce el consumo de materia seca y por ende el consumo de nutrientes en general (Galyean y Hubbert, 1995; Cole, 1996). Es por ello que la aplicación parenteral de elementos traza es una buena estrategia ante esta situación, ya que mejora el estatus de los animales independientemente del consumo y evita además, las interacciones ruminales y competencias por la absorción intestinal (Pogge y col., 2012). Chorfi y col. (2011) compararon la suplementación de Se parenteral con la vía oral, demostrando que los niveles plasmáticos de Se aumentaron dos semanas después de la aplicación subcutánea, mientras que las suplementaciones orales demoraron 4 semanas en lograrlo. Esto refuerza la idea de que quizás, los animales confinados del grupo CON (solo con aporte dietario de Se) necesiten un lapso mayor a 21 días para que reflejen un aumento en la actividad GPx.

Posiblemente el bajo estatus inicial de Se de los animales y la corrección de la deficiencia provocada con la suplementación, hayan facilitado el efecto observado sobre la GDP en estos experimentos. Si bien en este estudio no se determinó ningún indicador de estrés oxidativo, una menor capacidad antioxidante asociada a bajos niveles de actividad GPx podrían actuar como limitante en el crecimiento de los animales (Spears y col., 1986; Chirase y col., 2004; Asres y Amha, 2014; Puppel y col., 2015) o estar asociado a un mayor costo energético en la reparación del daño causado por el estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2015). Por otro lado, un adecuado estatus de Se (> 39.4 U/ml de Hto) en los grupos suplementados pudo haber facilitado la actividad de las hormonas tiroideas (Arthur, 1993; Wichtel y col., 1996; Hefnawy y Tórtora-Perez, 2010). Finalmente, aunque el experimento 2 no fue diseñado para evaluar la respuesta a la suplementación con Se bajo condiciones de estrés térmico, este factor se hizo presente. En este sentido se registraron las

condiciones climáticas mediante una estación meteorológica (Davis Vantage VUE Davis Instruments®) y se calculó el índice de temperatura y humedad (ITH) según Hahn y col. (2009); y las horas de exposición a condiciones de estrés térmico en base al algoritmo propuesto por St-Pierre y col. (2003). Según el índice de seguridad climática para bovinos de carne (LCI, 1970) los animales del experimento 2 estuvieron expuestos a condiciones de estrés térmico leve y moderado. Si bien son necesarios mayores estudios en relación al estrés térmico y la suplementación con Se, este tipo de estrés puede reducir el consumo de alimento y las ganancias de peso, generando un estado catabólico asociado al aumento del daño oxidativo (Bernabucci y col., 2002), con mayor producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Tanaka y col., 2008), y con reducción de la capacidad antioxidante y de la actividad de las hormonas tiroideas (Aengwanich y col., 2011; Alhidary y col., 2012), acciones en las que el Se participa de manera directa.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de estos dos ensayos demuestran que, bajo nuestras condiciones, la suplementación con selenito de sodio (0,1 mg Se/kg de peso vivo) aumentó la GDP y los niveles de actividad GPx, llevándolos desde niveles de deficiencia hasta valores de normalidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aengwanich W, Kongbuntad W, Boonsorn T. Effects of shade on physiological changes, oxidative stress, and total antioxidant power in Thai Brahman cattle. *Int J Biometeorol.* 2011; 55(5):741-8.
2. Alhidary IA, Shini S, Al Jassim RA, Gaughan JB. Effect of various doses of injected selenium on performance and physiological responses of sheep to heat load. *J. Anim Sci.* 2012; 90(9):2988-2994.
3. Ammerman CB, Miller SM. Selenium in ruminant nutrition: a review. *J. Dairy Sci.* 1975; 58(10): 1561-1577.
4. Arthur JR. The biochemical functions of selenium relationships to thyroid metabolism and antioxidant systems. Rowett Research Institute Annual Report. Backsburn, Aberdeen, UK. 1993.
5. Asres A, Amha N. Effect of stress on animal health: a review. *J Biol Agric Healthc.* 2014; 4(27): 116.
6. Bevans DW, Beauchemin KA, Schwartzkopf-Genswein KS, McKinnon JJ, McAllister TA. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 2005; 83:1116–1132.
7. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J. Dairy Sci.* 2002; 85(9):2173-9.
8. Bottje WG, Carstens GE. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *J. Anim Sci.* 2009; 87 (14): 48-63.
9. Brambilla E, Micheloud JF, Fernández E, Cseh S, Drake M, Poo JI. Deficiencia

- primaria de Se en bovinos en la provincia de Salta. *Revista Argentina de Producción Animal*. 2016; 36 (1): 33-70.
10. Burk RF, Hill KE. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr*. 2015; 35:109-34. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034250.
 11. Castellan DM, Maas JP, Gardner IA, Oltjen JW, Sween ML. Growth of suckling beef calves in response to parenteral administration of selenium and the effect of dietary protein provided to their dams. *J Am Vet Med Assoc*. 1999; 214(6):816-821.
 12. Ceballos A, Wittwer F. Metabolismo del selenio en ruminates. *Arch. Med. Vet*. 1996; 28: 5-18.
 13. Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Quiroz E, Böhmwal HL. Actividad de Glutación Peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de Selenio. *Pesq. agropec. bras*. 1999; 34 (12): 2331-2338.
 14. Chirase NK, Greene LW, Purdy CW, Loan RW, Auvermann BW, Parker DB, Walborg EF Jr, Stevenson DE, Xu Y, Klaunig JE. Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am J Vet Res*. 2004; 65(6):860-864.
 15. Chorfi Y, Girard V, Fournier A, Couture Y. Effect of subcutaneous selenium injection and supplementary selenium source on blood selenium and glutathione peroxidase in feedlot heifers. *Can Vet J*. 2011; 52(10):1089-1094.
 16. Cole NA. Review of bovine respiratory disease: Nutrition and disease interactions. *Veterinary Learning Systems*. 1996; 57-74
 17. Cseh S, Drake M, Brambilla E. Deficiencia de selenio en bovinos según época del año y región en Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal*. 2013; 33 (1): 17-43.

18. Droke EA, Loerch SC. Effects of parenteral selenium and vitamin E on performance, health and humoral immune response of steers new to the feedlot environment. *J. Anim Sci.* 1989; 67, (5): 1350-1359.
19. Duffy J, Miquet J, Ruksan BE. Enfermedad del músculo blanco en terneros de cría. *Vet. Arg.* 1986; 21(3),16-22.
20. Eitam H, Vaya J, Brosh A, Orlov A, Khatib S, Izhaki I, Shabtay A. Differential stress responses among newly received calves: variations in reductant capacity and Hsp gene expression. *Cell Stress Chaperones.* 2010; 15(6):865-76.
21. Enjalbert F, Lebreton P, Salat O, Schelcher F. Effects of pre-or postpartum selenium supplementation on selenium status in beef cows and their calves. *J. Anim Sci.* 1999; 77(1):223-229.
22. Enjalbert F, Lebreton P, Salat O. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2006; 90(11-12):459-466.
23. Enríquez D, Hötzel MJ, Ungerfeld R. Minimising the stress of weaning of beef calves: a review. *Acta Vet Scand.* 2011; 53(1):28. doi: 10.1186/1751-0147-53-28.
24. Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(5):1484-1491. doi:10.3945/ajcn.2010.28674J
25. Finch JM, Turner RJ. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Res Vet Sci.* 1996; 60(2):97-106.
26. Fishbein L. Environmental selenium and its significance. *Fundamental and Applied Toxicology.* 1983; 3, 411-419.
27. Galyean ML, DiLorenzo N, McMeniman JP, Defoor PJ. Alpharma Beef Cattle

- Nutrition Symposium: predictability of feedlot cattle growth performance. *J. Anim Sci.* 2011; 89(6):1865-1872.
28. Galyean ML, Hubbert ME. Effects of season, health, and management on feed intake by beef cattle. Symposium: Intake by Feedlot Cattle. Oklahoma Agric. Exp. Stn. EEUU. 1995; 226–234.
 29. Genter ON. Trace mineral supplementation in feedlot cattle: implications for the inflammatory response, growth, and carcass characteristics. 2014. Graduate Theses and Dissertations. 14134. <https://lib.dr.iastate.edu/etd/14134>.
 30. Gil S, Hevia S, Dallorso M, Resnizky S. Selenium in bovine plasma, soil and forage measured by neutron activation analysis. *Bras. Med. Vet. Zootec.* 2004; 56(2): 264-266.
 31. Gunter SA, Beck PA, Phillips JM. Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves. *J. Anim Sci.* 2003; 81:856–864.
 32. Hahn GL, Gaughan JB, Mader TL, Eigenberg RA. Livestock energetics and thermal environmental management, Chapter 5: Thermal indices and their applications for livestock environments. J. A. American Society of Agricultural and Biological Engineers. St. Joseph, EEUU. 2009; 113–130.
 33. Hall JA, Bobe G, Hunter JK, Vorachek WR, Stewart WC, Vanegas JA, Estill CT, Mosher WD, Pirelli GJ. Effect of feeding selenium-fertilized alfalfa hay on performance of weaned beef calves. *PLoS ONE.* 2012; 8(3): e58188. doi:10.1371/journal.pone.0058188.
 34. Hall JA, Bobe G, Vorachek WR, Hujerjiletu, Gorman ME, Mosher WD, Pirelli GJ. Effects of feeding selenium-enriched alfalfa hay on immunity and health of weaned beef calves. *Biol Trace Elem Res.* 2013; 156(1-3):96-110.

35. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5 ed. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press. 2015.
36. Hefnawy AEG, Tórtora-Pérez JL. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Res.* 2010; 89 (2–3):185-192. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.12.042.
37. Hidiroglou M, Jekins KM. Effects of selenium and vitamin e, and copper administrations on weight gains of beef cattle raised in a selenium-deficient area. *Can J Anim Sci.* 1975; 55(3): 307-313
38. Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(3):3145-3175.
39. Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales E, Bertin G. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2008; 86:3100-3109.
40. Kegley EB, Ball JJ, Beck PA. Impact of mineral and vitamin status on beef cattle immune function and health. *J. Anim Sci.* 2016; 94(12):5401–5413.
41. Kubota J, Allaway WR, Carter DL, Cary EE, Lazar VA. Selenium in crops in the United States in relation to selenium-responsive diseases of livestock. *J Agric Food Chem.* 1967; 15:448–453.
42. Larson CK. Role of trace minerals in animal production. Nutrition Conference sponsored by Department of Animal Science, UT Extension and University Professional and Personal Development The University of Tennessee. 2005. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/94f6/2d58d563de87cc1e99ab920fbffd7b311447.pdf>
43. LCI. Patterns of transit losses, Livestock Conservation Inc. Omaha, EEUU. 1970.

44. Levander OA. Trace elements in human and animal nutrition. Vol. 2. 5 ed. Academic Press, Inc. Orlando, EEUU. 1986.
45. Loerch SC, Fluharty FL. Physiological changes and digestive capabilities of newly received feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 1999; 77:1113–1119
46. Maas J. Deficiencia de Se en el ganado bovino. En: XVI Congreso Mundial de Buiatria. Salvador, Bahia, Brasil. 1990; pp. 3-13.
47. Mac Donald DW, Christian RG, Whenham GR, Howell J. A review of some aspects of vitamin E-selenium responsive diseases with a note on their possible incidence in Alberta. *Can Vet J.* 1976; 17, 61-71.
48. McDowell LR. Minerals in Animal and Human Nutrition. Academic Press, Inc. San Diego, California, EEUU. 1992.
49. Mehdi Y, Dufrasne I. Selenium in Cattle: A Review. *Molecules.* 2016; 21 (4): 545. doi:10.3390/molecules21040545
50. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 1993; 76: 2812-2823.
51. Minatel L, Buffarini MA, Scarlata Villegas EF, Dallorso ME, Carfagnini JC. Niveles de cobre, zinc, hierro y selenio en bovinos del noroeste de la provincia de Buenos Aires. *Revista Argentina de Producción Animal.* 2004; 24 (3-4): 225-235.
52. Némoz JP. Principales características de la actividad ganadera vacuna en el área de la EEA Cuenca del Salado. Informe INTA-RIAN. 2013. Disponible en <https://inta.gob.ar/documentos/principales-caracteristicas-de-la-actividad-ganadera-vacuna-en-elarea-de-la-eea-cuenca-del-salado>.
53. Noffsinger T, Lukasiewicz K, Hyder L. Feedlot Processing and Arrival Cattle Management. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2015; 31(3):323-40. doi:

10.1016/j.cvfa.2015.06.002.

54. National Research Council. Nutrient requirements of beef cattle. 8 rev. ed. The National Academies Press, Washington, DC. 2000.
55. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characteristics of erythrocyte peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70:158–169.
56. Perry TW, Beeson WM, Smith WH, Mohler MT. Effect of supplemental selenium on performance and deposit of selenium in blood and hair offfinishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 1976; 42, 192–195.
57. Pogge DJ, Richter EL, Drewnoski ME, Hansen SL. Mineral concentrations of plasma and liver after injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle. *J. Anim Sci.* 2012; 90(8):2692-8.
58. Puppel K, Kapusta A, Kuczyńska B. The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. *J Sci Food Agric.* 2015; 95(11): 2179-84.
59. Randox Laboratories. Technical brief. Crumlin, Reino Unido. 2009.
60. Reffett JK, Spears JW, Hatch PA, Brown TT. Influence of selenium and zinc on performance, blood constituents, and immune response in stressed calves. *Biol Trace Elem Res.* 1986; 9 (3):139-49.
61. Rodriguez AM, Romero RA, Odriozola ER, Garcia JA, Brambilla EC, Armendano JI, Canton GJ. Enfermedad del músculo blanco en terneros para cría en Provincia de Buenos Aires. X Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE). 2016.
62. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973; 9; 179(4073):588-590.
63. Ruksan, BE. Deficiencia de selenio. Reunión científica técnica, Asociación argentina

- de veterinarios de laboratorios de diagnóstico. Mar del Plata, Argentina. 1998.
64. Senasa. Estadísticas ganaderas. [Consulta diciembre 2017]. Disponible en <http://senasa.gob.ar/información/informes-y-estadísticas/movimientos>.
 65. Spears JW, Harvey RW, Segerson EC. Effects of marginal selenium deficiency and winter protein supplementation on growth, reproduction and selenium status of beef cattle. *J. Anim Sci.* 1986; 63(2):586-594.
 66. Spears JW, Kegley EB. Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 2002; 80:2747-2752.
 67. St-Pierre NR, Cobanov B, Schnitkey G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J. Anim. Sci.* 2003; 86 (31):52-77.
 68. Suttle NF. Mineral Nutrition of Livestock, 4 ed. Oxfordshire, UK. 2010. pp 377–425. doi:10.1079/9781845934729.0255.
 69. Swecker WS, Hunter KH, Shanklin RK, Scaglia G, Fiske DA, Fontenot JP. Parenteral Selenium and Vitamin E Supplementation of Weaned Beef Calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2008; 22: 443-449.
 70. Tanaka M, Kamiya Y, Suzuki T, Kamiya M, Nakai Y. Relationship between milk production and plasma concentrations of oxidative stress markers during hot season in primiparous cows. *Anim Sci.* 2008; 79:481–486.
 71. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(3-4):134-44.
 72. Thompson KG, Fraser AJ, Harrop BM, Kirk JA, Bullians J, Cordes DO. Glutathione peroxidase activity and selenium concentration in bovine blood and liver as indicators of dietary selenium intake. *N Z Vet J.* 1981; 29:3–6.

73. Van Saun RJ, Herdt TH, Stowe HD. Maternal and fetal selenium concentrations and their interrelationships in dairy cattle. *J Nutr.* 1989; 119 (8): 1128-37.
74. Vittone, JS, Munilla ME, Lado M, Corne M, Ré AE, Biolatto A, Galli IO. Experiencias de recría y engorde con raciones secas en autoconsumo. Estación experimental agropecuaria Concepción del Uruguay. 2015. INTA.
75. Ward JD, Spears JW. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. *J. Anim. Sci.* 1997; 75:3057-3065.
76. Wichtel JJ, Craigie AL, Freeman DA, Varela-Alvarez H, Williamson NB. Effect of selenium and iodine supplementation on growth rate and on thyroid and somatotropic function in dairy calves at pasture. *J. Dairy Sci.* 1996; 79(10):1865-1872.

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SELENIO SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ EN VACAS INSEMINADAS A TIEMPO FIJO Y LA CALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS CULTIVADOS IN VITRO

INTRODUCCIÓN

El Se es un mineral traza esencial para los bovinos debido a su presencia estructural en al menos 30 enzimas de la familia de las selenoproteínas (Ammerman y Miller, 1975; Beckett y Arthur, 2005). Debido a su presencia dentro de las GPx, históricamente se lo asoció con su función antioxidante y el control de las EROs (Rotruck y col., 1973). Sin embargo, estas selenoproteínas también están involucradas en diversos procesos fisiológicos, incluidos el crecimiento, la función inmune, el metabolismo de las hormonas tiroideas y la reproducción, tanto en la hembra como en el macho.

Según las concentraciones plasmáticas de Se, el estatus mineral en el ganado bovino es definido como deficiente, marginal y adecuado cuando sus concentraciones son < 50 , de $50-83$, y > 83 ng/ml de Se, respectivamente (Pehrson y col., 1986; Smith y col., 1988; Gerloff, 1992; Ceballos y Wittwer, 1996). Se ha demostrado que la suplementación con Se en vacas deficientes está asociada con mejoras en el desempeño reproductivo (Hosnedlova y col., 2017). Por un lado, este efecto podría ser indirecto, al mejorar la inmunidad. Por ejemplo, en vacas lecheras la suplementación con Se disminuye la incidencia de metritis y retención placentaria (Harrison y col., 1984; Spears y Weiss, 2008), y a su vez resulta en una involución uterina más rápida (Harrison y col., 1986). Estos efectos sobre la salud uterina se

deberían a una mejora en la función de los neutrófilos y linfocitos (Hemingway, 2003). Por otro lado, se informa de un efecto directo del Se. En este sentido, se ha demostrado recientemente que la suplementación oral con Se en vacas lecheras en transición aumenta el porcentaje de concepción a la primera inseminación (Khalili y col., 2019). Sin embargo, la bibliografía sobre el efecto de la suplementación con Se en bovinos de carne es contradictoria. Segerson y col. (1977) reportaron un 100% de fecundación en vacas suplementadas con Se y vitamina E mantenidas en un plano nutricional adecuado, mientras que Southcott y col. (1972) y Scales (1976) no lograron mejorar los porcentajes de preñez con la suplementación con Se. La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una tecnología que los productores de ganado de carne vienen empleando paulatinamente, con el fin de aumentar el progreso genético y el rendimiento reproductivo de sus rodeos (Bó y Baruselli, 2014). Aún no se conoce cuál es el efecto de la suplementación parenteral con Se al inicio de un protocolo de IATF en bovinos.

En los mamíferos, la fecundación ocurre en la ampolla del oviducto y durante este período las gametas femeninas y masculinas dependen de los nutrientes provistos por el fluido oviductal (FO; Ellington, 1991; Bavister, 2000). Si bien, el estudio de los componentes del FO bovino comenzó en la década del 50 (Olds y Vandemark, 1957), aún no se conoce cuál es la concentración de Se en ese fluido. Se ha demostrado para el cobre, otro mineral traza, que su concentración en el FO bovino está dentro del rango plasmático (Anchordoquy y col., 2017). La composición iónica del FO es importante para la maduración de ovocitos y espermatozoides y para la posterior fecundación (Grippio y col., 1992; Bavister, 2000). El proceso de fecundación está sujeto a la capacidad del espermatozoide bovino de atravesar el tracto reproductor de la hembra, traspasar la zona pelúcida (ZP) y unirse al ovocito. La unión del espermatozoide a ZP es uno de los procesos fundamentales durante el

proceso de fertilización (Okabe, 2013) y las fallas en esta unión se asocian con infertilidad debido a una menor capacidad fecundante de los espermatozoides (Overstreet y col., 1980; Oehninger y col., 1997).

La deficiencia de Se se asocia con alteraciones de la motilidad espermática y, dependiendo de la severidad de la misma, alteraciones estructurales y ruptura en la zona de la pieza media (Wu y col., 1973; Calvin y col., 1981). Una menor capacidad antioxidante, asociada a la deficiencia de este elemento, puede resultar en daño oxidativo del ADN y en lipoperoxidación de la membrana plasmática, aumentando su permeabilidad con la consecuente disminución de la motilidad espermática (Slaweta y col., 1988; Irvine, 1996; Shalini y Bansal 2007; Kaushal y Bansal 2009; Qazi y col., 2019). Estas alteraciones provocan finalmente una disminución de la capacidad de fusión entre el espermatozoide y el ovocito (Sánchez-Gutiérrez y col., 2008; Chandra y col., 2012).

En consecuencia, se diseñaron una serie de experimentos con el fin de estudiar 1) el efecto *in vivo* de la suplementación parenteral con Se al inicio de un protocolo de IATF sobre el porcentaje de preñez en hembras bovinas, y 2) el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de Se (basadas en los distintos estatus de este elemento en los bovinos) sobre la calidad de los espermatozoides cultivados en medio de fecundación *in vitro* (FIV). Para este último punto se evaluó la integridad estructural y la integridad funcional de la membrana plasmática, el estatus acrosomal (EA) de los espermatozoides, su capacidad de unión a la ZP, los niveles de malondialdehído (MDA) y el estatus antioxidante total (EAT) de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Protocolo número 51-3-15T).

Ensayos in vivo

Animales y protocolo de IATF

Se utilizaron un total de 262 vacas Aberdeen Angus con una condición corporal de $3 \pm 0,19$ (evaluada dentro de la escala de 1-5; Houghton y col., 1990), provenientes de 2 establecimientos comerciales ubicados en la Cuenca deprimida del Río Salado, en la Provincia de Buenos Aires (Establecimiento A: $35^{\circ}32'52.9''S$ $58^{\circ}07'28.6''W$; Establecimiento B: $35^{\circ}15'38.6''S$ $57^{\circ}38'03.0''W$). En ambos establecimientos, las vacas se mantuvieron antes y durante el desarrollo del experimento, en un sistema de pastoreo extensivo sobre pastizales naturales, y fueron manejadas bajo el mismo protocolo de trabajo. El Día 0, antes de iniciar cualquier maniobra sobre el animal se tomó una muestra de sangre de la vena yugular, y luego se le inició un protocolo convencional de IATF, el cual consistió en la colocación de un dispositivo intravaginal de progesterona (1 g P4, DIB®, Syntex, Argentina) y la aplicación por vía intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (EB, Syntex). A su vez, en ese momento los animales fueron divididos en dos grupos de manera aleatoria para recibir el tratamiento, que consistió en: 1) una única aplicación SC de 0,1 mg Se/kg de peso vivo como selenito de sodio (Grupo Se), o 2) el mismo volumen de solución fisiológica estéril (ClNa 0,9%; grupo control; Grupo CON). En el Día 7 se retiraron los

DIB®, y todos los animales recibieron una dosis de prostaglandina F_{2α} (150 µg D + cloprostenol; Ciclase, Syntex) y 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn, Syntex) por vía IM. Todas las vacas fueron inseminadas entre las 52 y 56 h posteriores a la extracción de los DIB® (Cutaia y col., 2003). El diagnóstico de preñez se realizó, en todos los casos, luego del segundo sangrado a los 40 días de la inseminación (Día 49 del experimento), con un ecógrafo Aloka SSD 500, 5MHz.

Recolección de sangre y determinaciones de hematocrito y actividad GPx

Las muestras de sangre se tomaron por venopunción yugular utilizando una jeringa y aguja estériles por animal. Se recolectaron en tubos plásticos con heparina sódica como anticoagulante. Los tubos se mantuvieron refrigerados durante el muestreo y se trasladaron al laboratorio en recipientes térmicos con hielo. En el laboratorio se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento.

El porcentaje Hto se determinó por centrifugación en capilar (microhematocrito), empleando una microcentrífuga Rolco CH 24 (5 minutos a 12000 rpm). La actividad GPx en sangre entera se evaluó mediante método colorimétrico utilizando el kit comercial RANSEL (Cat. Num. RS 504, Laboratorio Randox Ltd, Crumlin, Reino Unido) y un espectrómetro UV/VIS (Lambda 25 - Perking Elmer) según el método de Paglia y Valentine (1967). La enzima GPx cataliza la oxidación de GSH por el hidroperóxido de cumeno. En presencia de la enzima GR y NADPH, el GSSG es inmediatamente convertido en su forma reducida con la consecuente oxidación del NADPH a NADP⁺. Brevemente, se diluyeron 0,05 ml de sangre en 2 ml del diluyente suministrado por el kit. Luego 0,01 ml de sangre diluida y hemolizada fueron colocados en tubos de vidrio con 0,5 ml del reactivo conformado

por 4 mmol/l de GSH, 0,5 U/l de GR y 0,34 mmol/l de NADPH y 0,02 ml de hidroperóxido de cumeno. Para el blanco se utilizaron 0,01 ml de agua destilada. La absorbancia inicial y la absorbancia luego de 2 minutos fueron medidas para las muestras y blancos a 340 nm en el espectrómetro. Los controles de calidad se realizaron utilizando RANSEL Control. La concentración de GPx se calculó como U/l del hemolizado = $8412 \times \Delta A$ a 340nm, donde ΔA = variación entre la absorbancia inicial y a los 2 min. Luego se multiplicó por el factor de dilución (41) y se realizó el cociente para cada muestra por su valor de hematocrito. La actividad de GPx fue finalmente expresada en U/ml Hto. La actividad de esta enzima, como marcador biológicamente activo del estatus mineral en los bovinos, define el estatus de los animales en deficiente, bajo, marginal y adecuado (< 18, 18,5 – 30,3, 30,3 – 39,4 y > 39,4 U/ml Hto, respectivamente; Maas, 1990; Ceballos y col., 1999; Tapiero y col., 2003; Juniper y col., 2008; Randox, 2009).

Las muestras de sangre del campo “A” obtenidas el día 49 perdieron la cadena de frío, por lo tanto, los datos de GPx del campo “A” se excluyeron del estudio.

Ensayos in vitro

Reactivos y medios

Todos los reactivos utilizados para la preparación de los medios de cultivo fueron adquiridos de la empresa Sigma Chemical Co. (San Luis, Misuri, Estados Unidos). El medio de mantenimiento consistió en medio HEPES-199 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). El medio de maduración *in vitro* (MIV) utilizado fue buffer bicarbonato TCM-199 suplementado con 10% (v/v) de SFB, 0,2 mM de piruvato de sodio, 1 mM de

glutamina, 1 $\mu\text{g/ml}$ de FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health, Estados Unidos) y 1 $\mu\text{g/ml}$ de 17 β -estradiol. El medio de FIV consistió en TALP suplementado con 2% (v/v) MEM-aminoácidos esenciales, 1% (v/v) MEM-aminoácidos no esenciales, 6 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF, por sus siglas en inglés), 20 μM de penicilamina, 10 μM de hipotaurina y 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina sulfato (Parrish y col., 1986). La solución acuosa de selenito de sodio utilizada fue comprada a la empresa Merck (Tokio, Japón).

Preparación del semen

En todos los experimentos se utilizó semen congelado del mismo toro y del mismo lote, de fertilidad probada tanto *in vitro* como *in vivo*. Las pajuelas con 40×10^6 espermatozoides, fueron descongeladas en baño de agua a 37 °C. Los espermatozoides fueron lavados en un gradiente discontinuo de Percoll, preparado colocando 2 ml de la solución de Percoll al 45% sobre 2 ml de la solución de Percoll al 90% (ambas soluciones a temperatura ambiente) en un tubo de centrifuga de 15 ml. Las muestras de semen fueron depositadas sobre el gradiente de Percoll y centrifugadas a 500 g por 20 minutos. El pellet formado (espermatozoides vivos) fue removido y resuspendido en 300 μl de la solución HEPES-TALP y nuevamente centrifugado a 300 g por 10 minutos. Luego de descartado el sobrenadante, los espermatozoides fueron resuspendidos en medio FIV, contados en una cámara hemocitométrica y posteriormente diluidos a una concentración final de 10×10^6 espermatozoides/ml. Los espermatozoides fueron mantenidos en incubación a 39 °C en una atmósfera con 5% CO_2 en aire y humedad a saturación. El medio de FIV fue suplementado con concentraciones de 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se, las cuales fueron establecidas de acuerdo

al estatus de Se del ganado bovino (control, deficiente, marginal y adecuado, respectivamente).

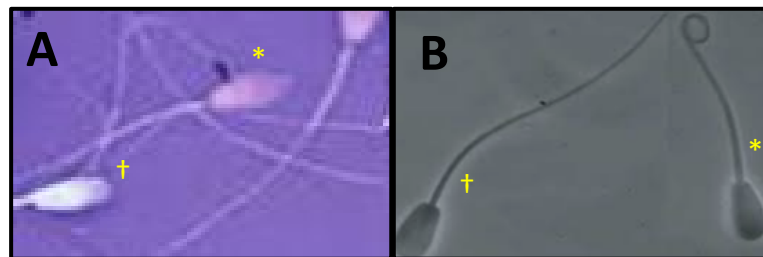
Evaluación de la integridad estructural (viabilidad) y funcional de las membranas plasmáticas

El semen se preparó de la misma manera que se explica en la sección “Preparación del semen” y se incubó en medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se, a 39 °C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire y humedad a saturación. Se evaluó una alícuota en tres momentos diferentes (0, 3 y 6 h) para determinar viabilidad e integridad funcional de la membrana plasmática.

La integridad estructural de la membrana plasmática se determinó utilizando la tinción eosina-nigrosina (Maes y col., 2011). Los espermatozoides con alteraciones en la permeabilidad de su membrana plasmática permiten el ingreso de la tinción adquiriendo un color rojo o rosado en su interior, mientras que aquellos que poseen su membrana plasmática íntegra no permiten el ingreso del colorante, observándose de color blanco al microscopio (Figura 4.1). Brevemente, se colocaron 20 µl de semen con 20 µl de la tinción eosina-nigrosina (SpermVitalStain™, NidaCon International AB, Suecia), se homogeneizaron con un suave pipeteo y se incubaron por 30 segundos a temperatura ambiente. Luego, 20 µl de la mezcla de espermatozoides y tinción se colocaron en un portaobjetos y se dejaron secar al aire por 30 minutos. Finalmente, se contaron un total de 200 espermatozoides por tratamiento en al menos cinco campos microscópicos diferentes, considerándose espermatozoides muertos a todos aquellos espermatozoides con color rojo o rosado y vivos a aquellos espermatozoides de color blanco.

La integridad funcional de la membrana plasmática se evaluó utilizando la prueba de hinchazón hipoosmótica (HOST, por sus siglas en inglés; Revell y Mrode, 1994). Cuando los espermatozoides son expuestos al estrés hipoosmótico, el agua y elementos de bajo peso molecular intentan atravesar la membrana plasmática para alcanzar un equilibrio osmótico. La prueba de HOST predice la integridad de membrana mediante la evaluación de su capacidad en mantener el equilibrio osmótico entre el espermatozoide y el medio que lo rodea. El flujo de agua y de los elementos capaces de atravesar la membrana hacia el interior del espermatozoide incrementan su volumen alterando su morfología (HOST positivo), mientras que aquellos espermatozoides con alteraciones en su membrana permanecen sin cambios (HOST negativo; Figura 4.1). Brevemente, se incubaron 25 μ l de semen en 200 μ l de solución HOST (100 mOsm/l, 57.6 mM de fructosa y 19.2 mM de citrato de sodio) por 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron 10 μ l de la muestra previamente homogeneizada y se colocaron directamente en un portaobjetos, sobre el cual se colocó inmediatamente un cubreobjetos. Se contaron un total de 200 espermatozoides por tratamiento en al menos cinco campos microscópicos diferentes, y se registró el porcentaje de espermatozoides HOST positivo (flagelo hinchado y enrollado).

Figura 4.1. Espermatozoides observados en microscopio óptico, evaluados mediante la tinción de eosina-nigrosina y la prueba de hinchazón hipoosmótica (HOST).



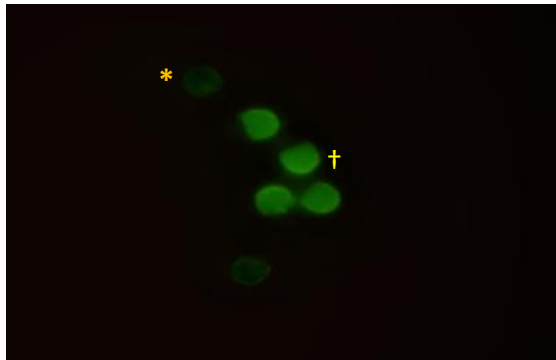
Los espermatozoides se observan en el microscopio óptico con un aumento de 1000x. A: Los espermatozoides con alteraciones en la permeabilidad de su membrana plasmática permiten el ingreso del colorante (se observan de color rojo, *), mientras que aquellos que poseen su membrana plasmática íntegra no permiten el ingreso del colorante (se observan de color blanco, †); B: En los espermatozoides con membrana plasmática funcional el flujo de agua y de los elementos capaces de atravesarla hacia el interior del espermatozoide incrementa su volumen alterando la morfología espermática (HOST positivo, *), mientras que aquellos espermatozoides con alteraciones en su membrana permanecen sin cambios (HOST negativo, †).

Evaluación del estatus acrosomal

El semen se preparó de la misma manera que se explica en la sección “Preparación del semen” y se incubó en medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se, a 39 °C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire y humedad a saturación. Se evaluó una alícuota en tres momentos diferentes (0, 3 y 6 h) para determinar el EA de los espermatozoides utilizando una aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC; por sus siglas en inglés; Sigma Chemical Company, San Luis, Misuri, Estados Unidos), como fue descrito anteriormente por Mendoza y col. (1992). Brevemente, se realizaron frotis de semen sobre portaobjetos, se dejaron secar al aire y se fijaron con metanol por 30 segundos. Luego se tiñeron utilizando 50 mg/ml de PSA-FITC en buffer fufato

salino (PBS, por sus siglas en inglés) por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y montados. Se contaron un total de 200 espermatozoides por muestra con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX40 (Olympus, Tokyo, Japón) utilizando ondas de excitación de 450-490 nm con un aumento de 1000x. La región acrosómica de aquellos espermatozoides con el acrosoma intacto fue PSA-FITC positiva y se tiñó de verde, mientras que aquellos espermatozoides con el acrosoma dañado presentaron solo una banda de tinción ecuatorial con un poco o nada de tinción en la región anterior de la cabeza (Figura 4.2).

Figura 4.2. Estatus Acrosomal de espermatozoides bovinos utilizando una aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína.



Los espermatozoides se observan en un microscopio de fluorescencia, con ondas de excitación de 450-490 nm y un aumento de 1000x. La región acrosómica los espermatozoides con el acrosoma intacto se tiñó de verde (†), mientras que aquellos espermatozoides con el acrosoma dañado pueden presentar solo una banda de tinción ecuatorial con un poco o nada de tinción en la región anterior de la cabeza (*).

Ensayo de unión de espermatozoides a la zona pelúcida

Los ovarios de hembras Aberdeen Angus, de los cuales se extrajeron los complejos ovocito-cúmulus (COCs), fueron obtenidos en un frigorífico comercial, independientemente

de la etapa del ciclo estral de la hembra donante. Fueron transportados al laboratorio dentro de las 3 horas posteriores a la faena en una solución estéril de NaCl (9 g/l) con antibióticos y mantenidos a 37-39 °C.

Los COCs fueron aspirados de folículos con un diámetro entre 3 y 8 mm utilizando una aguja de 18-G conectada a una jeringa estéril. Luego se colectaron los COCs utilizando un estereomicroscopio de baja potencia (20-30 X) y platina térmica a 39°C, y se colocaron en medio de mantenimiento hasta el momento de la selección por calidad. Solo aquellos complejos con el cúmulus intacto y el citoplasma uniformemente granulado fueron seleccionados para la MIV. Posteriormente recibieron un doble lavado en buffer TCM-199 con 15 mM de HEPES y otro doble lavado en medio MIV. Grupos de 10 COCs fueron transferidos a gotas de 50 µl de medio de maduración bajo aceite mineral (Squibb, Princeton, Nueva Jersey, Estados Unidos) previamente equilibradas en una incubadora de CO₂. La incubación fue realizada a 39 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y aire saturado de humedad por 24 h. Los COCs madurados fueron incubados en buffer fosfato con 0,1 % (p/v) de hialuronidasa por 5 minutos a 37 °C. Luego fueron despojados de las células del cúmulus mediante un pipeteo suave. Los ovocitos desnudos se lavaron 2 veces en medio HEPES-TALP suplementado con 3 mg/ml de BSA-FAF y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su uso. El día de la prueba, se atemperaron y se colocaron en gotas de 50 µl de medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se bajo aceite mineral. Las gotas con los ovocitos (10 ovocitos por gota) y los espermatozoides se incubaron por 2 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. El semen se preparó como se explicó en la sección “Preparación del semen”, utilizando dos pajuelas por réplica. Luego de la incubación, los ovocitos fueron transferidos a PBS, suplementado con 10% (v/v) de SFB y lavados tres veces para remover los espermatozoides libres utilizando una pipeta Pasteur. Una vez lavados, los ovocitos se

tiñeron con Hoechst 33342, se montaron sobre portaobjetos sobre el cual se colocó un cubreobjetos. El número de espermatozoides unidos a cada ovocito fue determinado por observación bajo un microscopio de epifluorescencia Olympus BX40 a 400x de aumento.

Evaluación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Los niveles de peroxidación lipídica se midieron utilizando el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés). Las concentraciones de TBARS en la suspensión de espermatozoides se midió por espectrofotometría y se expresaron como niveles de MDA (nmol MDA/ 10^6 espermatozoides), utilizando tetrametoxipropano (TMP) como estándar. Se mezcló una alícuota de 100 μ l de la suspensión de espermatozoides con 100 μ l de la solución de SDS al 8,1% y 750 μ l de la solución de ácido acético al 20%. Luego se agregaron 750 μ l de la solución de TBA al 0,8% y 2 ml de agua destilada y se incubó en horno a 95 °C por 1 hora. Después se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 4220 g por 15 minutos. Finalmente, la absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm utilizando un espectrofotómetro. El nivel de MDA se determinó posteriormente en base a la comparación con la curva estándar de TMP.

Evaluación del estatus antioxidante total

La determinación del EAT se realizó con el método colorimétrico utilizando el kit de estatus antioxidante total de Randox (cat num. NX2332, Laboratorios Randox Ltd, Crumlin, Reino Unido). Brevemente, se agregaron 20 μ l de la suspensión de espermatozoides a 1 ml del cromógeno 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato) (ABTS). Como estándar se

utilizaron 20 μ l de ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2 carboxílico (Trolox) a una concentración de 2,27 mmol/l, mientras que como blanco se utilizaron 20 μ l de agua desionizada. El cromógeno (1 ml) se agregó a los estándares y al blanco. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14.000 g por 10 segundos. La absorbancia del sobrenadante se midió a los 3 minutos de agregado el sustrato, con un espectrofotómetro a 600 nm. Los resultados se expresaron en mmol/l. La variabilidad intraensayo se calculó a partir de mediciones por duplicado.

Diseño experimental

Efecto de la suplementación inyectable con Se al inicio de un protocolo de IATF sobre el porcentaje de preñez de hembras bovinas

En el Experimento 1 se evaluó el efecto de la suplementación parenteral con Se sobre la tasa de preñez luego de un protocolo de IATF. Para este experimento se utilizaron 262 animales aportados por dos establecimientos comerciales (71 animales por el Establecimiento “A” y 191 animales por el Establecimiento “B”). En ambos establecimientos los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos homogéneos (Se y CON) como se mencionó anteriormente. En todos los animales se realizó el diagnóstico de preñez a los 40 días posteriores a la IATF. Las muestras de sangre fueron tomadas en los días 0 y 49 del experimento. Los resultados fueron expresados como porcentajes.

Efecto del Se sobre la integridad estructural de la membrana plasmática (viabilidad)

En el Experimento 2 se evaluó la viabilidad de espermatozoides incubados por 0, 3 y 6 h en medio FIV suplementado con distintas concentraciones de Se (0, 10, 50 y 100 ng/ml

de Se) mediante la utilización de la técnica de tinción con eosina-nigrosina. Fueron realizadas 3 réplicas en tres días diferentes, utilizando un pool de 3 pajuelas de semen por réplica que luego fue dividido en los 4 tratamientos. Los resultados están expresados como porcentajes de las tres réplicas independientes.

Efecto del Se sobre la integridad funcional de la membrana plasmática

En el Experimento 3 se evaluó la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides incubados por 0, 3 y 6 h en medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se utilizando la prueba de HOST. Para este propósito se realizaron 3 réplicas durante tres días diferentes utilizando un pool de 3 pajuelas de semen por réplica que luego fue dividido en los 4 tratamientos. Los resultados están expresados como porcentaje de los espermatozoides positivos a HOST de las tres réplicas independientes.

Efecto del Se sobre el estatus acrosomal

En el Experimento 4 se evaluó el EA de espermatozoides incubados por 0, 3 y 6 h en medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se utilizando la tinción con PSA-FITC como se describió anteriormente. Para este ensayo fueron realizadas 3 réplicas en tres días diferentes utilizando un pool de 3 pajuelas de semen por réplica que luego fue dividido en los 4 tratamientos. Los resultados están expresados como porcentaje de los espermatozoides con el acrosoma intacto (integridad de acrosomas) de las tres réplicas independientes.

Efecto del Se sobre la capacidad de unión de espermatozoides a la zona pelúcida

En el Experimento 5 se evaluó el efecto de la suplementación al medio FIV con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se sobre la capacidad de unión de los espermatozoides a la ZP. Los COCs madurados y despojados de sus células del cúmulus fueron incubados junto con los espermatozoides en medio de FIV suplementado con las distintas concentraciones de Se. Luego, se tiñeron con Hoechst 33342 y el número de espermatozoides unido a cada ovocito fue contabilizado como se describió anteriormente. Para este propósito se utilizaron 102 COC en tres réplicas (distintos grupos de ovarios para cada día). Los resultados están expresados como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de las réplicas independientes.

Efecto del Se sobre los niveles de peroxidación lipídica

En el experimento 6 se evaluaron los niveles de MDA de la suspensión de espermatozoides luego de 2 h de incubación en medio FIV suplementado con 0 ó 100 ng/ml de Se utilizando el método de TBARS. Este experimento se realizó en 3 réplicas durante 3 días distintos, utilizando un pool de 3 pajuelas de semen por réplica. Los resultados están expresados como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de las tres réplicas independientes.

Efecto del Se sobre el estatus antioxidante total

En el experimento 7, se evaluó el EAT de la suspensión de espermatozoides luego de 2 h de incubación en medio FIV suplementado con 0 ó 100 ng/ml de Se. Este experimento se realizó en 3 réplicas durante 3 días distintos, utilizando un pool de 3 pajuelas de semen por réplica. Los resultados están expresados como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de las tres réplicas independientes.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio en bloques. Para el ensayo *in vivo*, el modelo estadístico incluyó el efecto aleatorio del bloque (establecimiento, $n=2$), el efecto fijo del tratamiento (CON vs. Se) y su interacción (establecimiento*tratamiento). Para los ensayos *in vitro*, el modelo estadístico incluyó el efecto aleatorio del bloque (réplicas, $n=3$) y el efecto fijo del tratamiento (0 vs. 10 vs. 50 vs. 100 ng/ml de Se). Las variables como porcentaje de preñez, viabilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y el EA se analizaron con una regresión logística utilizando el procedimiento GENMOD de SAS (SAS Institute Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos). La unión de los espermatozoides a la ZP, la peroxidación lipídica y el EAT se analizaron utilizando modelos lineales con el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute). En el caso de la actividad de GPx se utilizó un modelo lineal de medidas repetidas en el tiempo. La significancia estadística se estableció en $P < 0,05$ y $P \leq 0,10$ para tendencia e interacciones.

RESULTADOS

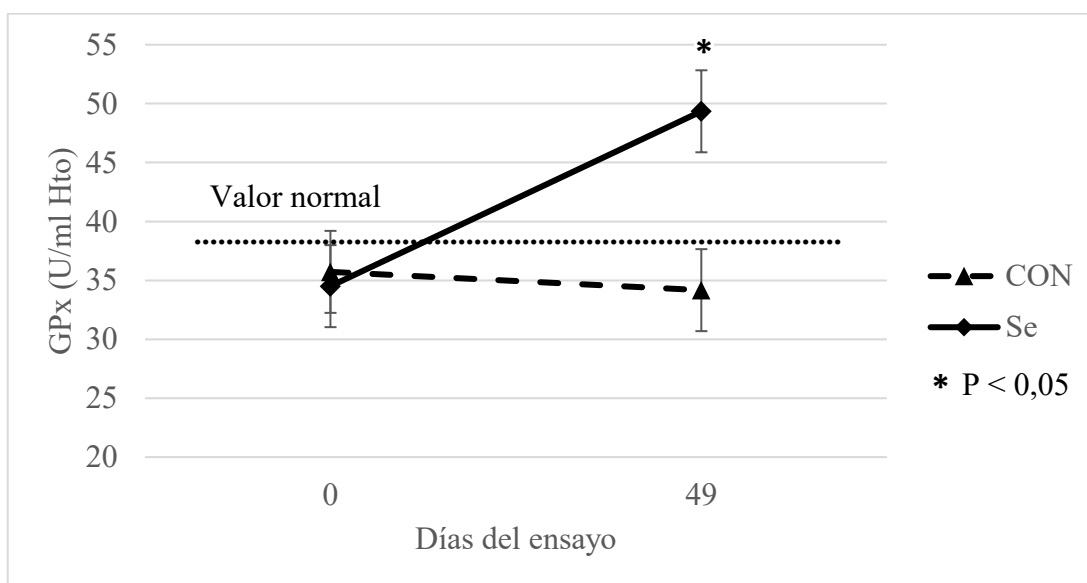
Efecto de la suplementación parenteral con Se al inicio de un protocolo de IATF sobre el porcentaje de preñez de hembras bovinas

En el Experimento 1, la suplementación con Se tendió a incrementar el porcentaje de preñez, siendo en las vacas suplementadas del 74,62% y en el grupo control del 65,78% (OR = 1,53; Intervalo de confianza 95% = 0,91 – 2,57; $P = 0,10$). El establecimiento tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de preñez ($P < 0,05$); el porcentaje en el establecimiento “A” fue 80,4% mientras que en el establecimiento “B” fue 57,87%. La

interacción establecimiento*tratamiento no tuvo efecto estadísticamente significativo ($P > 0,10$).

Por otro lado, la actividad de la GPx se incrementó a los 49 días del ensayo en los animales del grupo Se, permaneciendo constante en los animales del grupo CON (tiempo: $P < 0,05$; tratamiento: $P > 0,05$; tiempo*tratamiento: $P < 0,05$; Figura 4.3).

Figura 4.3. Efecto de la suplementación inyectable con Se sobre la actividad de GPx en sangre entera en vacas suplementadas al inicio del protocolo de IATF (Campo “B”).



Los animales fueron suplementados con Se (0,1 mg/kg peso vivo; grupo Se) y con solución fisiológica estéril (ClNa 0,9%; grupo CON) el día 0 del ensayo. Los animales fueron sangrados al día 0 y 49. Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM (4,48 U/ml Hto). Valor considerado como normal: $> 39,4$ U/ml Hto.

Efecto del Se sobre la integridad estructural de la membrana plasmática (viabilidad)

En el Experimento 2, la viabilidad de los espermatozoides luego de 3 y 6 h de cultivo fue mayor cuando el medio FIV fue suplementado con Se ($P < 0,05$; Tabla 4.1).

Efecto del Se sobre la integridad funcional de la membrana plasmática

En el experimento 3, la suplementación del medio FIV con Se incrementó el número de espermatozoides HOST positivos luego de la incubación por 3 h ($P < 0,05$). Sin embargo, a las 6 h solo la suplementación con 50 ng/ml logró incrementar la integridad funcional de la membrana plasmática comparado con el grupo control ($P < 0,05$; Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Integridad estructural (viabilidad) y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos luego de la incubación por 0, 3 y 6 h en medio FIV suplementado con Se.

Suplementación con Se (ng/ml)	Espermatozoides HOST					
	Viabilidad (%)			positivos (%)		
	0 h	3 h	6 h	0 h	3 h	6 h
0	80	71 ^a	67 ^a	62 ^a	47 ^a	54 ^a
10	76	80 ^b	79 ^b	64 ^a	59 ^b	58 ^{ab}
50	76	81 ^b	81 ^b	62 ^a	62 ^b	64 ^b
100	80	80 ^b	79 ^b	61 ^a	60 ^b	59 ^{ab}

Los espermatozoides fueron incubados en medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se.

La viabilidad se evaluó utilizando la técnica de tinción con eosina-nigrosina y la integridad funcional de la membrana plasmática utilizando la técnica de HOST, ambas en 3 intervalos de tiempo (0, 3 y 6 h). La viabilidad está expresada como porcentaje de los espermatozoides blancos que no permiten el ingreso del colorante de la tinción de eosina-nigrosina de las tres réplicas independientes. La integridad funcional de la membrana plasmática está expresada como porcentaje de los espermatozoides positivos a HOST de las tres réplicas independientes^{a, b} Valores con diferente superíndice dentro de cada columna indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Efecto del Se sobre el estatus acrosomal

En el Experimento 4, los resultados demuestran que el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto es mayor luego de la incubación en medio FIV suplementado con Se, tanto a las 3 como a las 6 h ($P < 0,05$; Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Integridad de acrosomas en espermatozoides bovinos luego de la incubación por 0, 3 y 6 h en medio FIV suplementado con Se.

Suplementación con Se (ng/ml)	Integridad de acrosomas (%)		
	0 h	3 h	6 h
0	66,6	56 ^a	53,4 ^a
10	65,5	65,3 ^b	63,4 ^b
50	65,4	68,0 ^b	61,4 ^b
100	65,5	65,9 ^b	61,4 ^b

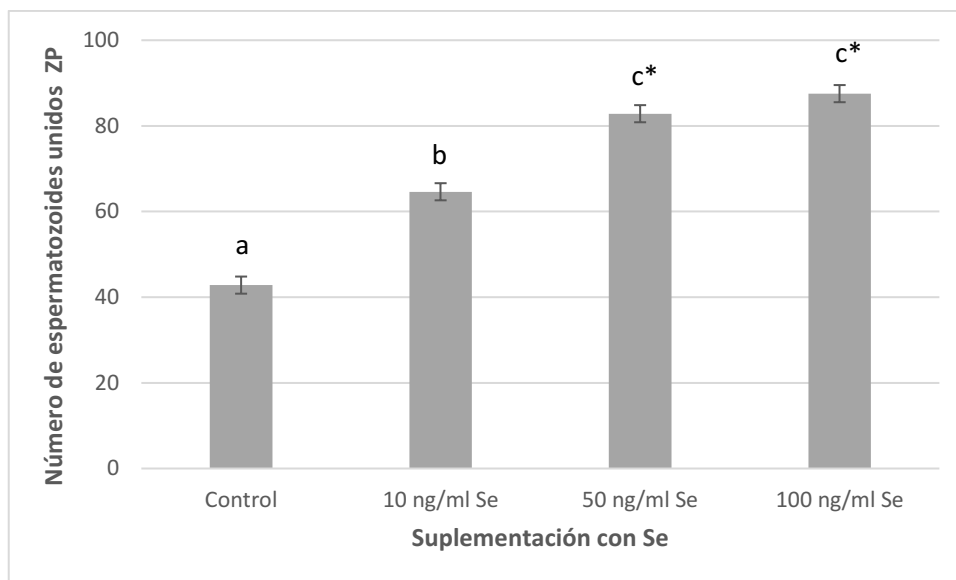
Los espermatozoides fueron incubados en medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se y el EA se evaluó utilizando la tinción con PSA-FITC en 3 intervalos de tiempo (0, 3 y 6 h). Los resultados están expresados como porcentaje de integridad acrosómica de las tres réplicas independientes. ^{a, b} Valores con diferente superíndice dentro de cada columna indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Efecto del Se sobre la capacidad de unión de espermatozoides a la zona pelúcida

En el Experimento 5, los resultados demostraron un mayor número de espermatozoides unidos a la ZP cuando se adicionó Se al medio FIV en todas las concentraciones estudiadas ($P < 0,05$). Las mayores diferencias se encontraron con el agregado de 50 y 100 ng/ml, sin embargo, la suplementación con 100 ng/ml tendió a

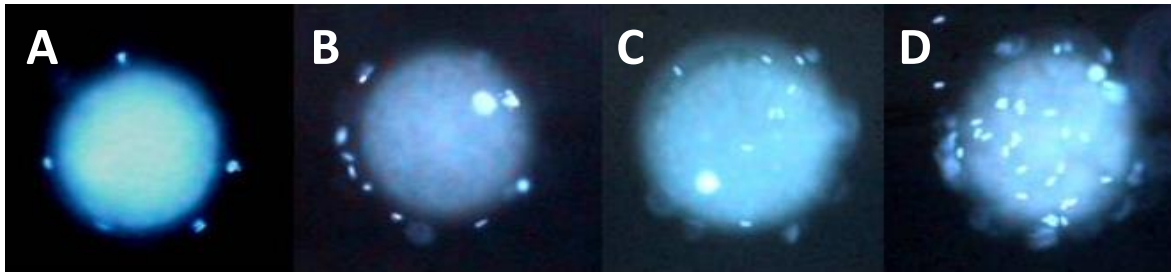
aumentar el número de espermatozoides unidos a la ZP con respecto a 50 ng/ml Se ($P < 0,10$; Figura 4.4 y Figura 4.5).

Figura 4.4. Espermatozoides unidos a la ZP luego de la incubación con diferentes concentraciones de Se.



Los ovocitos y espermatozoides se incubaron por 2 h en medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se. El número de espermatozoides unidos a la ZP está expresado como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM (1,99 espermatozoides unidos ZP) de las tres réplicas independientes. ^{a - c} Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$); Barras con (*) tendieron a ser diferentes ($P < 0,10$). ZP: Zona pelúcida

Figura 4.5. Espermatozoides bajo microscopio de epifluorescencia unidos a la ZP luego de la incubación con diferentes concentraciones de Se.



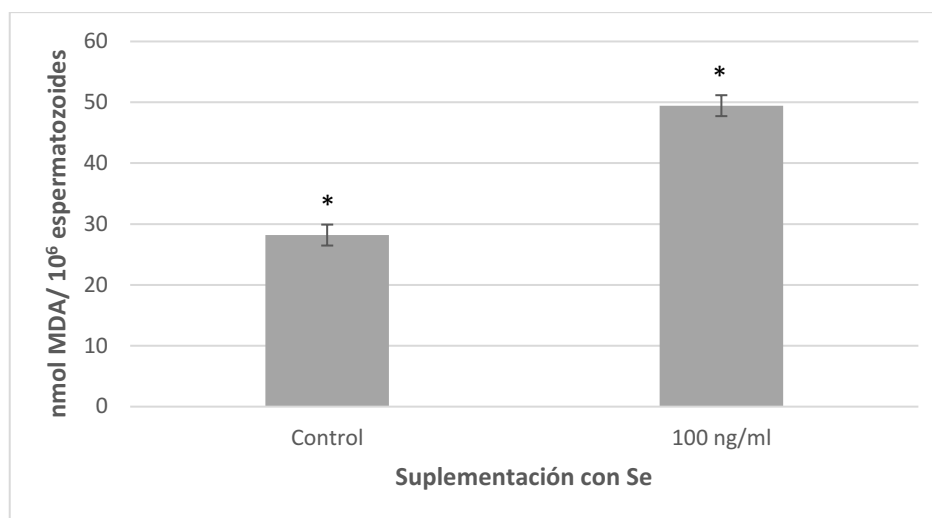
Los ovocitos y espermatozoides se incubaron por 2 h en medio FIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se. El número de espermatozoides teñidos con el colorante Hoechst 33342 y unidos a cada ovocito fue determinado por observación bajo un microscopio de epifluorescencia Olympus BX40 a 400x de aumento. A: Control; B: 10ng/ml Se; C: 50ng/ml Se; D: 100 ng/ml Se.

El objetivo de los experimentos 6 (TBARS) y 7 (EAT) fue determinar el rol de la lipoperoxidación en la unión del espermatozoide a la ZP, ya que se ha demostrado una gran participación de la misma en este proceso. Por lo tanto, se escogió para los experimentos de TBARS y EAT la concentración de Se que obtuvo el mejor resultado en este experimento (100 ng/ml), así como también, corresponde a este experimento el momento de sus evaluaciones (2 h de incubación).

Efecto del Se sobre los niveles de peroxidación lipídica

En el experimento 6, la suplementación con Se tendió a incrementar la concentración de MDA con respecto al control ($P < 0,10$; Figura 4.3)

Figura 4.3. Efecto de la suplementación con Se sobre la concentración de MDA luego de 2 h de incubación.

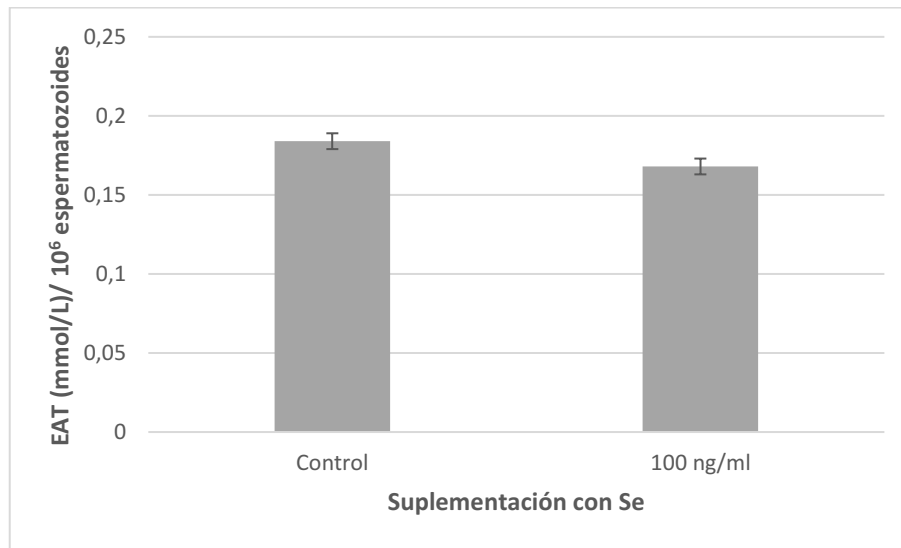


Los espermatozoides se incubaron por 2 h en medio FIV suplementado con 0 y 100 ng/ml de Se. La concentración de MDA está expresada como nmol MDA/ 10⁶ espermatozoides. Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM (1,72 nmol MDA/ 10⁶ espermatozoides) de las tres réplicas independientes. Barras con (*) tendieron a ser diferentes ($P < 0,10$). MDA: Malondialdehido.

Efecto del Se sobre el estatus antioxidante total

En el experimento 7, no hubo diferencia en el EAT de espermatozoides tratados con 100 ng/ml de Se ($P > 0,05$; Figura 4.4).

Figura 4.4. Efecto de la suplementación con Se sobre el EAT luego de 2 h de incubación.



Los espermatozoides se incubaron por 2 h en medio FIV suplementado con 0 y 100 ng/ml de Se. La concentración del EAT está expresada como mmol/L/ 10⁶ espermatozoides. Los datos están expresados como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM (0,005 (mmol/L/ 10⁶ espermatozoides) de las tres réplicas independientes. EAT: Estatus antioxidante total.

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación parenteral con Se al inicio de un protocolo de IATF sobre el porcentaje de preñez en hembras bovinas. En bovinos, el rol del Se en la reproducción ha sido relacionado principalmente con la disminución de las muertes embrionarias en los primeros 20 a 30 días de gestación y con la salud uterina (Kumar y col., 2011; Mehdi y Dufrasne, 2016). A su vez, el aumento de la fertilidad en las hembras atribuido a este elemento se ha relacionado con la protección del cuerpo lúteo frente a los peróxidos lipídicos generados durante la producción de progesterona (Kamada y Ikumo, 1997; Kamada y col., 2014). En este estudio, la

suplementación con Se al inicio de un protocolo de IATF tendió a incrementar el porcentaje de preñez e incrementó la actividad de GPx en la sangre en las hembras bovinas. Las vacas suplementadas con Se tuvieron una chance 1,53 veces mayor de quedar preñada que las no suplementadas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Tasker y col. (1987), quienes observaron un aumento en el porcentaje de preñez y un aumento en el estatus de Se en vacas lecheras suplementadas con selenato de bario. En el mismo sentido, Aréchiga y col. (1994) aumentaron el porcentaje de preñez y redujeron el número de servicios por concepción en vacas lecheras suplementadas con Se y vitamina E. En sentido contrario, Morrow y col. (1981), Hidoroglou y col. (1987) y Stowe y col. (1988) no encontraron diferencias significativas sobre el desempeño reproductivo luego de la suplementación con Se.

Las gametas femeninas y masculinas dependen de los nutrientes provistos por el FO. Esto ha llevado a diversos autores a estudiar la composición del mismo, sin embargo, aún no se conoce cuál es la concentración de Se en dicho fluido. En este estudio, el medio de FIV fue suplementado con concentraciones de Se similares a las observadas en los fluidos corporales de las hembras bovinas, como el plasma sanguíneo y el fluido folicular (Underwood y Suttle, 1999; Lizarraga y col., 2019). La membrana plasmática es responsable del mantenimiento del equilibrio osmótico de la célula, y su integridad es crucial para la supervivencia de los espermatozoides, tanto dentro del tracto reproductor de la hembra como en condiciones *in vitro* (Õura y Toshimori, 1990). Nuestros resultados demostraron que la suplementación con Se (10, 50 y 100 ng/ml) mejora la viabilidad de los espermatozoides bovinos luego de 3 y 6 h de incubación. Esto está en concordancia con lo observado por Dorokstar y col (2012) y Jamali y col. (2019), quienes mejoraron la viabilidad de los espermatozoides de búfalos luego del congelado/descongelado con el agregado de Se al diluyente del semen. En ese mismo estudio, Dorokstar y col (2012) también reportaron que

la suplementación con Se tiene un efecto positivo sobre la integridad funcional de la membrana plasmática. En ensayos realizados *in vivo* Gallo y col., (2003), Marai y col. (2009) y El-Sharawy y col. (2017) mejoraron la viabilidad espermática en gallos, carneros y búfalos, respectivamente, con la suplementación oral de Se. Se ha observado también, que dicha suplementación aumenta la resistencia osmótica de la membrana acrosomal en cerdos (Jacyno y col., 2002) y disminuye el daño acrosomal en carneros (Marai y col., 2009). En el presente trabajo, la suplementación del medio FIV con Se mejoró la integridad funcional de la membrana plasmática luego de 3 h y 6 h de incubación. Además, el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto fue mayor a las 3 y 6 h para todas las concentraciones de Se estudiadas. Debido a que solo los espermatozoides móviles y que poseen su membrana plasmática y acrosoma sin daños son capaces de unirse y fertilizar al ovocito (Hoodbhoy y Dean, 2004; Varghese col., 2005), prevenir el deterioro funcional y estructural de la célula espermática es esencial para mantener la fertilidad (Ursini y col., 1999; Shi y col., 2010; Ahsan y col., 2014).

Aunque se ha demostrado que el efecto antioxidante del Se protege a los espermatozoides del daño oxidativo (Ahsan y col., 2014), en el presente estudio la suplementación con 100 ng/ml de Se aumentó los niveles de MDA en los espermatozoides. No está claro por qué la suplementación con Se incrementó los niveles de lipoperoxidación. Una posible explicación es que, en este estudio el Se fue suplementado en forma de sal inorgánica de selenito de sodio. El selenito sufre una reducción dependiente de tiol para formar seleniuro antes de ser incorporado a las selenoproteínas específicas, oxidando el glutatión de su estado reducido (GSH) a su estado oxidado (GSSG; Batist y col., 1986; Stadtman, 1996). El posible rol pro-oxidante de esta sal inorgánica (Stolwijk y col., 2020) podría verse reflejado también en el EAT dado que, si bien el efecto no fue significativo, el

selenito redujo numéricamente el EAT de los espermatozoides. Se ha demostrado que, aunque niveles elevados de EROs tienen efectos negativos sobre los espermatozoides, en cantidades fisiológicas promueven el proceso de capacitación espermática (Baumber y col., 2003; Rivlin y col., 2004; Roy y Atreja, 2008; Gonçalves y col., 2010). De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados demuestran que la concentración que tuvo el mayor incremento en el número de espermatozoides unidos a la ZP (100 ng/ml Se), aumentó los niveles de MDA. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Aitken y col. (1989) y Kodama y col. (1996) quienes demostraron que la inducción de lipoperoxidación leve incrementa la unión de espermatozoides a la ZP y la capacidad de fertilización. En 1982, Segerson y Libby (1982) encontraron mayor cantidad de espermatozoides unidos a óvulos fecundados en el tracto reproductor de hembras bovinas suplementadas con Se y vitamina E.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la presencia de Se en el medio de fecundación mejora de la calidad *in vitro* del espermatozoide. Vale la pena aclarar que en el presente estudio se empleó semen de un solo toro, por lo tanto, el resultado no contempla la variabilidad que podría existir entre individuos. Teniendo en cuenta el desempeño observado, sería interesante determinar si el efecto del Se sobre la calidad espermática se encuentra condicionado por la variabilidad individual, así como también, cual es la importancia del Se sobre la funcionalidad espermática en el tracto reproductivo de la hembra bovina, y como esto podría afectar el proceso de fecundación.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos *in vivo* demostraron que la suplementación con Se tendió a aumentar el porcentaje de preñez luego de la IATF. Por otro lado, los

resultados obtenidos *in vitro* demostraron que el agregado de Se al medio FIV aumenta la viabilidad, la integridad funcional de la membrana plasmática y el EA de los espermatozoides. Además, la suplementación con 100 ng/ml de Se aumentó el número de espermatozoides unidos a ZP y los niveles espermáticos de MDA. Estos resultados sugieren que el Se podría actuar como un factor importante en la fertilidad de la hembra bovina cuando es aplicado al inicio de un protocolo de IATF y en la calidad de los espermatozoides bovinos cultivados *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz MH, Iqbal Z. Role of selenium in male reproduction - A review. *Anim. Reprod. Sci.* 2014; 146:55–62.
2. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989; 41:183-197.
3. Ammerman CB, Miller SM. Selenium in ruminant nutrition: a review. *J. Dairy Sci.* 1975; 58 (10): 1561-1577.
4. Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Pascua AM, Nikoloff N, Peral-García P, Furnus CC. The copper transporter (SLC31A1/CTR1) is expressed in bovine spermatozoa and oocytes: Copper in IVF medium improves sperm quality. *Theriogenology.* 2017; 97: 124-133. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.04.037.
5. Aréchiga CF, Ortíz O, Hansen PJ. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. *Theriogenology.* 1994; 41: 121-1258.
6. Batist G, Katki AG, Klecker RW, Myers CE. Selenium-induced cytotoxicity of human leukemia cells: interaction with reduced glutathione. *Cancer Res.* 1986; 46:5482-5485.
7. Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology.* 2003; 60: 1239-1247.
8. Bavister BD. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology.* 2000; 53:619-626.

9. Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol.* 2005; 184(3): 455-465.
10. Bo GA, Baruselli, PS. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal.* 2014; 8(1):144-150. doi:10.1017/S1751731114000822.
11. Calvin HI, Wallace E, Cooper GW. The role of selenium in the organization of the mitochondrial helix in rodent spermatozoa. in: Selenium in Biology & Medicine, J.E. Spallholz, J.L. Martin and H.E. Ganther, editors, AVI, Westport, CT, 1981; 319-324.
12. Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Quiroz E, Böhmwal HL. Actividad de Glutación Peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de Selenio. *Pesq. agropec. bras.* 1999; 34 (12): 2331-2338.
13. Ceballos MA, Wittwer F. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch Med Vet.* 1996; 28: 5-18.
14. Chandra, G, Agarwal A, Singh A, Singh AK, Kumar M, Kushwaha R, Singh YK. Oxidative stress in sperm biology - A review. *Agric. Rev.* 2012; 33: 54-61.
15. Cutaia L, Veneranda G, Tríbulo R, Baruselli PS, Bó GA. Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Rodeos de Cría: Factores que lo Afectan y Resultados Productivos. V° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba. 2003; 119-132.
16. Dorostkar K, Alavi-Shoushtari SM, Mekarizadeh A. Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Research Forum.* 2012; 3 (4):263-268

17. Ellington JE. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet.* 1991; 81:313-328.
18. El-Sharawy M, Eid E, Darwish S, Abdel-Razek I, Islam MR, Kubota K, Yamauchi N, El-Shamaa I. Effect of organic and inorganic selenium supplementation on semen quality and blood enzymes in buffalo bulls: selenium effects on buffalo semen quality. *Anim Sci J.* 2017; 88: 999–1005. doi: 10.1111/asj.12736.
19. Gallo R, Veronico M, Nacucchi O, Tafaro E, Barile P, Nicastro F, Zezza L. The effects of selenium, zinc and vitamin E supplementation on performance of broiler breeder males. *Ital. J. Anim. Sci.* 2003; 2 (1):471-473.
20. Gerloff BJ. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 1992; 70:3934-3940.
21. Gonçalves FS, Barretto LS, Arruda RP, Perri SH and Mingoti GZ. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45:129-135.
22. Grippo AA, Henault MA, Anderson SH, Killian GJ. Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 1992; 75:58-65. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77738-8.
23. Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR. Vitamin E and Selenium for reproduction of the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 1984; 67:123-132.
24. Harrison JH, Hancock DD, St. Pierre N, Conrad HR, Harvey WR. Effect of prepartum selenium treatment on uterine involution in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 1986; 69: 1421-1425.

25. Hemingway RG. The influences of dietary intakes and supplementation with selenium and vitamin E on reproduction diseases and reproductive efficiency in cattle and sheep. *Vet Res Commun.* 2003; 27 (2): 159-174.
26. Hidiroglou M, McCallister AJ, Williams CJ. Parturition supplementation of selenium and vitamin E to dairy cows: assessment of selenium status and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 1987; 70:1281.
27. Hoodbhoy T, Dean J. Insights into the molecular basis of sperm egg recognition in mammals. *Reproduction.* 2004; 127: 417-422.
28. Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Malevu TD, Sochor J, Baron M, Melcova M, Zidkova J, Kizek R. A Summary of New Findings on the Biological Effects of Selenium in Selected Animal Species - A Critical Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18, 2209; doi:10.3390/ijms18102209.
29. Houghton PL, Lemenager RP, Horstman LA, Hendrix KS, Moss GE. Effects of body composition, pre and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. *J. Anim. Sci.* 1990; 68:438–446. doi: 10.2527/1990.6851438x.
30. Irvine, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.* 1996; 1: 6-12.
31. Jacyno E, Kawecka M. Influence of inorganic Se + vitamin E and organic Se + vitamin E on reproductive performance of young boars. *A F Sci.* 2002; 11:175-184.
32. Jamali NU, Kaka A, Khatri P, Malhi M, Naeem M, Memon AN, Kaleri RR, Janyaro H, Hussain Kalhoro D. Effect of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in kundhi buffalo bull and

- in vivo fertility rate. *Pakistan J. Zool.* 2019; 51(1):317-323. doi:10.17582/journal.pjz/2019.51.1.317.323.
33. Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales E, Bertin G. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2008; 86:3100-3109.
34. Kamada H, Ikumo H. Effect of selenium on cultured bovine luteal cells. *Anim Reprod Sci.* 1997; 46:203-211.
35. Kamada H, Nonaka I, Takenouchi N, Amari M. Effects of selenium supplementation on plasma progesterone concentrations in pregnant heifers. *Animal Science Journal.* 2014; 85:241-246. doi: 10.1111/asj.12139.
36. Kaushal N, Bansal M. Diminished reproductive potential of male mice in response to selenium induced oxidative stress: Involvement of HSP70, HSP70-2, and MSJ-1. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2009; 23:125-136.
37. Khalili M, Chamani M, Amanlou H, Nikkhah A, Sadeghi AA, Dehkordi FK, Rafiei M, Shirani V. The effect of feeding inorganic and organic selenium sources on the hematological blood parameters, reproduction and health of dairy cows in the transition period. *Acta Dci. Anim. Sci.* 2019; 42, e45371. doi: 10.4025/actascianimsci.v42i1.45371.
38. Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl.* 1996; 17, 151–7.
39. Kumar S, Kumar Pandey A, Razzaque WAA, Kumar Dwivedi D. Importance of micro minerals in reproductive performance of livestock. *Veterinary World.* 2011; 4(5): 230-233.

40. Lizarraga RM, Anchordoquy JM, Galarza EM, Fanetano NA, Carranza-Martin A, Furnus CC, Mattioli GA, Anchordoquy JP. Sodium Selenite Improves In Vitro Maturation of *Bos primigenius taurus* Oocytes. *Biol Trace Elem Res*. 2019. doi: 10.1007/s12011-019-01966-2.
41. Maas J. Deficiencia de Se en el ganado bovino. En: XVI Congreso Mundial de Buiteria. Salvador, Bahia, Brasil. 1990;pp: 3-13.
42. Maes D, Lopez-Rodriguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Soom AV. Artificial insemination in pigs. In: Manafi M, editor. Artificial insemination in farm animals. Rijeka, Croatia: InTech; 2011. pp. 87-94.
43. Marai IFM, El-Darawany AHA, Ismail ESAF, Abdel-Hafez MAM. Reproductive and physiological traits of Egyptian Suffolk rams as affected by selenium dietary supplementation and housing heat radiation effects during winter of the sub-tropical environment of Egypt. *Arch Anim Breed*. 2009; 52, 402-409.
44. Mehdi Y, Dufrasne I. Selenium in Cattle: A Review. *Molecules*. 2016; 21 (4):545. doi: 10.3390/molecules21040545.
45. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil*. 1992; 95: 755–63.
46. Morrow D, Thomas JW, Main RJ. Effects of vitamin E and selenium on periparturient diseases and fertility in dairy cattle. *Bovine Practitioner*. 1981; 16:80-81.
47. Oehninger S, Mahony M, Ozgür K, Kolm P, Kruger T and Franken D. Clinical significance of human sperm–zona pellucida binding. *Fertil Steril*. 1997; 67:1121–1127.

48. Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*. 2013; 140: 4471-4479; doi: 10.1242/dev.090613
49. Olds D, VanDemark NL. Composition of luminal fluids in bovine female genitalia. *Fertil Steril*. 1957; 8(4): 345-354.
50. Ōura C, Toshimori K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int Rev Cytol*. 1990; 122: 105-151.
51. Overstreet JW, Yanagimachi R, Katz DF, Hayashi K, Hanson FW. Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: a study of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril*. 1980; 33, 534-542.
52. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characteristics of erythrocyte peroxidase. *J. Lab. Clin. Med*. 1967; 70:158–169.
53. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH, Firts NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 1986; 25:591–600. doi: 10.1016/0093-691x(86)90143-3.
54. Pehrson B, Hakkarainen J, Työppönen J. Nutritional muscular degeneration in young heifers. *Nord Vet Med*. 1986; 38:26-30.
55. Qazi IH, Angel C, Yang H, Zoidis E, Pan B, Wu Z, Ming Z, Zeng C, Meng Q, Han H, Zhou G. Role of selenium and selenoproteins in male reproductive function: a review of past and present evidences. *Antioxidants*. 2019; 8, 268. doi:10.3390/antiox8080268.
56. Randox Laboratories. Technical brief. Crumlin, Reino Unido. 2009.
57. Revell SG, Mrode RA. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*. 1994; 36:77-86.

58. Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 2004; 70:518-522.
59. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973; 9; 179(4073):588-590.
60. Roy SC, Atreja SK. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2008; 107 (1–2):68–84.
61. Sánchez-Gutiérrez M, García-Montalvo E, Izquierdo-Vega J, Del Razo L. Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biol. Toxicol.* 2008; 24: 321-329.
62. Scales GH. Selenium and beef cow fertility. *New Zeland J. Exp. Agr.* 1976; 4: 297.
63. Segerson EC, Libby DW. Ova fertilization and sperm number per fertilized ovum for selenium and vitamin E treated Charolais cattle. *Theriogenology.* 1982; 17 (3); 333-341.
64. Segerson EC, Murray FA, Moxon AL, Redman DR, Conrad HR. Selenium/ vitamin E: Role in fertilization of bovine ova. *J. Dairy Sci.* 1977; 60: 1001.
65. Shalini, S, Bansal, M. Alterations in selenium status influences reproductive potential of male mice by modulation of transcription factor NFB. *Biometals.* 2007; 20: 49-59.
66. Shi L, Yang R, Yue W, Xun W, Zhang C, Ren Y, Shi L, Lei F. Effect of nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity and testis ultrastructure in male Boer goats. *Anim Reprod Sci.* 2010; 118 (2–4):248–254. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.10.003.

67. Slaweta R, Wasowicz W, Laskowska T. Selenium content, glutathione peroxidase activity, and lipid peroxide level in fresh bull semen and its relationship to motility of spermatozoa after freezing-thawing. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1988; 35: 455-460. doi: 10.1111/j.1439-0442.1988.tb00058.x.
68. Smith KL, Hogan JS, and Conrad HR. Selenium in dairy cattle: Its role in disease resistance. *Vet. Med.* 1988; 83:72-78.
69. Southcott WH, Wheller JL, Hill MK, Hedges DA. Effect of subdivision, stocking rate anthelmintic and selenium on the productivity of Hereford heifers. *Proc. Australian Soc. Anim. Prod.* 1972; 9: 408.
70. Sowe HD, Thomas JW, Johnson T, Marteniuk JV, Morrow DA, Ulrrey DE. Responses on dairy cattle to long-term and short-term supplementation with oral selenium and vitamin E. *J. Dairy Sci.* 1988; 71:1830-1839.
71. Spears JW, Weiss WP. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vete J.* 2008; 176: 70–76. doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.015.
72. Stadtman TC. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65:83–100.
73. Stolwijk JM, Garje R, Sieren JC, Buettner GR, Zakharia Y. Understanding the redox biology of Selenium in the search of targeted cancer therapies. *Antioxidants.* 2020; 9, 420. doi:10.3390/antiox9050420.
74. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(3-4):134-44.
75. Tasker JB, Bewick TD, Clark RG, Fraser AJ. Selenium response in dairy cattle. *N Z Vet J.* 1987; 35:8,139-140. doi: 10.1080/00480169.1987.35416.

76. Underwood EJ, Suttle NF. The mineral nutrition of livestock. third ed. Wallingford: CABI; 1999.
77. Ursini F, Heim S, Keiss M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. 1999; 285: 1393-1396.
78. Varghese AC, Sinha B, Bhattacharyya AK. Current trends in evaluation of sperm function: in vitro selection and manipulation of male gametes for assisted conception. *Indian J Exp Biol*. 2005; 43:1023-1031.
79. Wu ASH, Oldfield JE, Whanger PD, Weswig, PH. Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. *Biol. Reprod*. 1973; 8: 625–629.

CAPÍTULO V

EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SELENIO SOBRE LA MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS Y SU CAPACIDAD DE DESARROLLO POSTERIOR

INTRODUCCIÓN

El Se resulta esencial para la actividad reproductiva bovina, tanto en machos como en hembras (Boland, 2003; Mehdi y Dufrasne, 2016; Singh y col., 2018). Su deficiencia ha sido asociada con una serie de problemas reproductivos, como la retención placentaria y el incremento en la incidencia de metritis y ovarios quísticos (Spears y Weiss, 2008; Hefnawy y Tórtora-Pérez, 2010; Sordillo, 2013). La prevención de esta serie de desórdenes que responden a la suplementación con Se se asocia con incrementos en las tasas de fertilidad (Aréchiga col., 1998; Wichtel, 1998). Por otro lado, el Se incrementa la fertilidad al reducir las muertes embrionarias durante el primer mes de gestación (Mehdi y Dufrasne, 2016). Komisrud y col. (2005) demostraron que la suplementación con Se mejoró la tasa de concepción en el primer servicio en vacas lecheras deficientes en Se.

El Se es absorbido principalmente en el yeyuno y es transportado unido a α - y β -globulinas, lipoproteínas, y albúmina hacia el hígado (Schrauzer, 2000) donde es metabolizado y distribuido al organismo a través de la síntesis y liberación de SepP (Burk y Hill, 2015). Según las concentraciones plasmáticas de Se, el estatus mineral en el ganado bovino es definido como deficiente, marginal y adecuado (< 50 , $50-83$, y > 83 ng/ml de Se,

respectivamente; Pehrson y col., 1986; Smith y col., 1988; Gerloff, 1992; Ceballos y Wittwer, 1996).

El Se juega un rol importante en la defensa celular antioxidante ya que es un componente estructural de las selenoproteínas, como la familia de las GPx y las TrxRs entre otras, de actividad principalmente antioxidante (Brigelius-Flohé y Maiorino 2013). La GPx inactiva el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos tomando el poder reductor del GSH, convirtiéndolo en GSSG, en el sistema antioxidante GSH/GSSG (Mills, 1957; Rivera, 2005), mientras que las TrxRs ejercen su función antioxidante intracelular actuando a nivel del sistema redox de los tioles (Mustacich, 2000; Burk y Hill, 2015). El Se también juega un rol clave en el ciclo celular y la apoptosis, inhibiendo el daño genético (Zeng, 2009). Además, varios estudios han revelado que el Se regula la señalización intracelular, incluyendo la proteína quinasa C, el factor nuclear kappa B y la vía de la insulina (Gopalakrishna y col., 1997; Fontenelle y col., 2018).

El Se ha sido utilizado como suplemento en medios de cultivo, usualmente combinado con otros compuestos como insulina-tranferrina (Raghu y col., 2002; Jeong y col., 2008; Córdova y col., 2010) o calcio-calcio ionósforo (Makki y col., 2012). De acuerdo con Baker y col. (1998), los medios de cultivo celular son habitualmente deficientes en Se y por lo tanto, deben ser suplementados con concentraciones fisiológicas de este mineral traza. La mayoría de los investigadores han reportado la adición de concentraciones bajas o suprafisiológicas de Se a los medios de MIV (Córdova y col., 2010; Xiong y col., 2018). En estudios previos, ya se ha demostrado la importancia de suplementar los medios de MIV con concentraciones adecuadas de distintos minerales traza como el cobre, manganeso o zinc, y como estos mejoran la capacidad de desarrollo posterior de los ovocitos bovinos (Picco y col., 2010; Picco y col., 2012; Anchordoquy y col., 2013). Por otro lado, aunque varios

estudios han demostrado la importancia del Se en la producción *in vitro* de embriones (Raghu y col., 2002; Jeong y col., 2008; Córdova y col., 2010; Makki y col., 2012), el efecto de las concentraciones de este mineral durante la MIV dentro de los rangos de referencia para el estatus de Se en bovinos aún no ha sido evaluado.

En consecuencia, se diseñaron 7 experimentos con el fin de estudiar el efecto de la adición de Se (en concentraciones basadas en los distintos estatus de este elemento en los bovinos) sobre la MIV de ovocitos bovinos. Para ello se evaluó la viabilidad y la apoptosis de las células del cúmulus (CC); las concentraciones de GSH-GSSG intracelular, los niveles de MDA y el EAT en los COCs; y la maduración nuclear y la capacidad de desarrollo posterior de los ovocitos. Además, se evaluó la concentración de Se en el licor folicular y en el medio de MIV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y medios

Todos los reactivos utilizados para la preparación de los medios fueron adquiridos de la empresa Sigma Chemical Co. (San Luis, Misuri, Estados Unidos). El medio de mantenimiento consistió en medio HEPES-199 suplementado con 5 % de SFB. El medio de maduración utilizado fue TCM-199 suplementado con 10% (v/v) de SFB, 0,2 mM de piruvato de sodio, 1 mM de glutamina, 1 µg/ml de FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health, Estados Unidos) y 1 µg/ml de 17b-estradiol. El medio de fertilización consistió en TALP suplementado con 2% (v/v) MEM-aminoácidos esenciales, 1% (v/v) MEM-aminoácidos no esenciales, 6 mg/ml de BSA-FAF, 20 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina y 10 µg/ml de heparina (Parrish y col., 1986). El medio de cultivo para el desarrollo de los embriones

consistió en SOFm, el cual estuvo compuesto por SOF (Tervit y col., 1972) suplementado con 1 mM de glutamina, 2% (v/v) de MEM- aminoácidos esenciales, 1% (v/v) de MEM- aminoácidos no esenciales y 8 mg/ml de BSA-FAF (Gardner y col., 1994). La solución acuosa de selenito de sodio utilizada fue comprada a la empresa Merck (Tokio, Japón).

Maduración, fertilización y cultivo *in vitro*

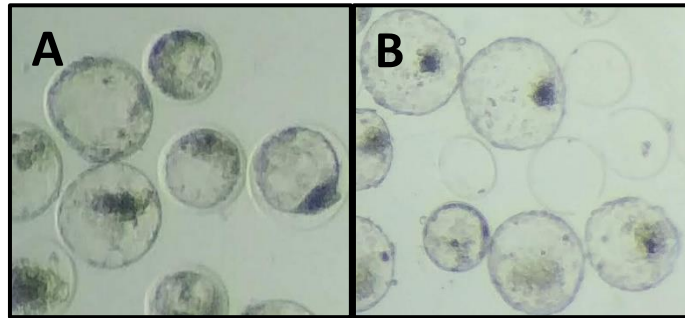
Los ovarios de hembras Aberdeen Angus, de los cuales se extrajeron los COCs, fueron obtenidos en un frigorífico comercial, independientemente de la etapa del ciclo estral de la hembra donante. Fueron transportados al laboratorio dentro de las 3 horas posteriores a la faena en una solución estéril de NaCl (9 g/L) con antibióticos y mantenidos a 37-39 °C.

Los COCs fueron aspirados de folículos con un diámetro entre 3 y 8 mm utilizando una aguja de 18-G conectada a una jeringa estéril. Luego se colectaron los COCs utilizando un estereomicroscopio de baja potencia (20-30 X) y platina térmica a 39°C, y se colocaron en medio de mantenimiento hasta el momento de la selección por calidad. Solo aquellos complejos con el cúmulus intacto y el citoplasma uniformemente granulado fueron seleccionados para la MIV. Posteriormente recibieron un doble lavado en buffer TCM-199 con 15 mM de HEPES y otro doble lavado en medio de MIV. Grupos de 10 COCs fueron transferidos a gotas de 50 µl de medio de MIV bajo aceite mineral (Squibb, Princeton, Nueva Jersey, Estados Unidos) previamente equilibradas en una incubadora de CO₂. Los COCs fueron madurados en medio de MIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se; estas concentraciones fueron establecidas de acuerdo con el estatus de Se del ganado bovino (control, deficiente, marginal y adecuado, respectivamente). La incubación fue realizada a 39 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación por 24 h. Para la

FIV, los ovocitos fueron lavados, sin quitarles las CC, dos veces en HEPES-TALP suplementado con 3 mg/ml de BSA-FAF y colocados en gotas de 50 μ l de medio FIV bajo aceite mineral y mantenidos en estufa a 39°C hasta el momento de la inseminación. En todos los experimentos se utilizó semen congelado del mismo toro y del mismo lote. Se utilizaron dos pajuelas, cada una conteniendo 40×10^6 espermatozoides, descongeladas en baño de agua a 37 °C. Los espermatozoides fueron lavados en un gradiente discontinuo de Percoll, preparado colocando 2 ml de la solución de Percoll al 45% sobre 2 ml de la solución de Percoll al 90% (ambas soluciones se encontraban a temperatura ambiente) en un tubo de centrífuga de 15 ml. Las muestras de semen fueron depositadas sobre el gradiente de Percoll y centrifugadas a 500 g por 20 minutos. El pellet formado (espermatozoides vivos) fue removido y resuspendido en 300 μ l de la solución HEPES-TALP y nuevamente centrifugado a 300 g por 10 minutos. Luego de descartado el sobrenadante, los espermatozoides fueron resuspendidos en medio FIV, contados en una cámara hemocitométrica y posteriormente diluidos a una concentración final de 10×10^6 espermatozoides/ml. La coincubación de los COCs con los espermatozoides se realizó por 24 h a 39 °C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire y humedad a saturación. Luego de la FIV, los presuntos cigotos fueron despojados de las CC por medio de pipeteo manual; lavados dos veces en medio HEPES-TALP y cultivados en medio SOFm. El cultivo *in vitro* de embriones (CIV) se llevó a cabo en gotas de 40 μ l de medio de CIV bajo aceite mineral (10 cigotos por gota) a 39 °C en una atmósfera de 7% de O₂, 5% de CO₂, 88% de N₂ y saturada de humedad. Todos los embriones fueron cultivados en ausencia de glucosa durante las primeras 24 h y luego cultivados por 9 días en presencia de 1,5 mM de glucosa. El medio de cultivo se renovó cada 48 h, y los embriones fueron incubados por 10 días (día 0 = día de la fertilización). La tasa de clivaje fue registrada 48 h luego de la inseminación. Al finalizar el período de incubación, el estado morfológico de

desarrollo embrionario fue evaluado con un microscopio invertido (Diaphot, Nikon, Tokio, Japón; Figura 5.1).

Figura 5.1. Embriones cultivados *in vitro* en diferentes estadios morfológicos del desarrollo.



Estado morfológico de los embriones evaluado en los días 8 y 10 de cultivo. A: blastocistos medianos y expandidos, día 8 de cultivo. B: blastocistos completamente eclosionados y ZPs vacías, día 10 de cultivo.

Análisis de la maduración nuclear de ovocitos

Luego de la MIV, los ovocitos se colocaron en gotas de TCM-199 con 0,2% de hialuronidasa a temperatura ambiente, y luego las CC fueron removidas por pipeteo manual. La maduración nuclear de los ovocitos se evaluó mediante el montaje y tinción de los ovocitos desnudos con Hoechst 33342, un colorante fluorescente que tiñe el ADN. Luego los ovocitos fueron examinados bajo un microscopio de epifluorescencia Olympus BX40 (Olympus, Tokio, Japón), y clasificados según su estado de maduración en: vesícula germinal (VG), metafase I (MI), anafase-telofase (A-T) o metafase II + corpúsculo polar (MII + CP; Süss y col., 1988; Izadyar y col., 1997). Los ovocitos con una configuración anormal de la cromatina, o sin cromatina fueron clasificados como degenerados (D). Los

resultados se expresaron como porcentaje de los ovocitos en los diferentes estados de maduración nuclear.

Evaluación de la viabilidad de las células del cúmulus

Luego de la maduración, la viabilidad de las CC se evaluó mediante la incubación de las mismas por 10 minutos a 37°C en un medio de PBS con 2,5 g/L del colorante azul de tripán. Luego de la tinción, las CC se lavaron en medio PBS y se observaron bajo un microscopio Olympus BX40 en un aumento de 200X. Las CC muertas mostraron una tinción azul característica bajo la luz blanca.

Evaluación de la apoptosis en las células del cúmulus mediante el ensayo de tinción con Anexina V

La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con alta afinidad por la fosfatidilserina (FS; Paasch y col., 2004; Glander y Schaller, 1999). La apoptosis temprana se evaluó mediante la redistribución de FS en la membrana con el kit de tinción Anexina-V-Fluos (Roche, cat. num. 11-858-777-001). El ensayo involucra tinciones simultáneas con Anexina-V-Fluos (verde) y con el colorante de ADN Ioduro de propidio (PI, rojo). Mientras que las células normales excluyen tanto el PI como la Anexina V, las células necróticas toman el PI y se tiñen de color rojo, mientras que las células apoptóticas tardías se tiñen de un color naranja/verde y las células apoptóticas tempranas se tiñen solamente de color verde. Brevemente, las células (1×10^6) se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a 200 g por 5 minutos. El pellet formado fue resuspendido en 100 ml de la solución marcadora Anexina-V-Fluos (Anexina V + fluoresceína, HEPES y PI) y fueron incubadas en cámara oscura por 10-15 minutos a 15-25 °C. La suspensión celular (50 μ l) se

colocó sobre un portaobjetos e inmediatamente se cubrió con un cubreobjetos. Se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia un total de 200 CC por tratamiento. El conteo se realizó con un aumento de 400X utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX40 equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm.

Ensayo de glutatión total

Luego de la MIV, todos los ovocitos de cada tratamiento ($n = 20$) se combinaron y fueron despojados de las CC que los rodeaban mediante pipeteo, con una pipeta de diámetro estrecho, en HEPES-TCM 199. Para cada réplica, los pools de ovocitos de cada tratamiento se colocaron en microtubos con 10 μ l PBS, se congelaron a -20°C y descongelaron a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió tres veces. La destrucción completa de los ovocitos se logró mediante aspiraciones repetidas utilizando una micropipeta. Las CC de al menos 20 COCs se transfirieron a tubos Eppendorf y se lavaron dos veces mediante resuspensión en PBS y centrifugación a 14.000 g por 10 segundos. El pellet formado se resuspendió en 500 μ l de PBS y la concentración celular se contó en una cámara hemocitométrica. Luego de una nueva centrifugación a 14.000 g por 10 segundos, el pellet formado se resuspendió en 40 μ l de PBS, se congeló a -20°C y se descongeló a temperatura ambiente. La destrucción de las CC se realizó mediante la adición de 400 μ l de agua destilada y aspiraciones repetidas con aguja 26-G. El agua destilada se agregó para incrementar el volumen de las muestras a 1,2 ml y luego se mezcló con 1,2 ml de buffer fosfato 0,2 M conteniendo 10 mM de EDTA. El incremento en la absorbancia se midió a 412 nm cada 30 segundos hasta completar 5 minutos utilizando un espectrofotómetro de doble haz, luego de agregar rápidamente 100 μ l de Ácido 5,5'-ditio-bis 2-nitrobenzoico (DTNB), 1 unidad de

glutación reductasa (en 50 μ l) y 50 μ l de NADPH 4,3 mM en PBS (10 μ L). El medio de lavado (10 μ l) fue utilizado como blanco. La concentración total de GSH (GSH-GSSG) en ovocitos y CC se calculó a partir de la curva estándar de GSH (Furnus y col., 1998).

Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Los niveles de peroxidación lipídica se midieron utilizando el método de TBARS. Las concentraciones de TBARS en los COCs se midió por espectrofotometría y se expresó como el nivel de MDA (nmol MDA/20 COCs) utilizando TMP como estándar. Luego de la MIV, todos los COCs de cada tratamiento (n = 20) se combinaron y se colocaron en microtubos con 100 μ l de PBS, se congelaron a -20°C y se descongelaron a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió 3 veces, el sobrenadante se mezcló con 100 μ l de la solución de SDS al 8,1% y con 750 μ l de ácido acético al 20%. Luego de agregar 750 μ l de la solución de TBA al 0,8% y 2 ml de agua destilada la mezcla se incubó en un baño de agua hirviendo por 1 hora. Después se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 4220 g por 15 minutos. Finalmente, la absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm utilizando un espectrofotómetro. El nivel de MDA se determinó posteriormente en base a la comparación con la curva estándar de TMP.

Ensayo de estatus antioxidante total

La determinación del EAT se realizó con el método colorimétrico utilizando el kit de estatus antioxidante total de Randox (cat num. NX2332, Laboratorios Randox Ltd, Crumlin, Reino Unido). Brevemente, luego de la MIV, todos los COCs de cada tratamiento (n = 20) fueron agrupados y colocados en microtubos con 100 μ l de PBS, congelados a -20°C y

descongelados a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió 3 veces y luego se añadieron 20 μ l del sobrenadante a 1 ml de ABTS. Como estándar se utilizaron 20 μ l de ácido 6-hidroxil-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2 carboxílico (Trolox) a una concentración de 2,27 mmol/L, mientras que como blanco se utilizó agua desionizada. El cromógeno (1 ml) se agregó a los estándares y al blanco. La absorbancia se midió a los 3 minutos de agregado el sustrato con un espectrofotómetro a 600 nm. Los resultados se expresaron en mmol/L. La variabilidad intraensayo se calculó a partir de mediciones por duplicado.

Determinación de la concentración de Selenio en licor folicular y en el medio de maduración

Los ovarios de hembras Aberdeen Angus se envolvieron en film plástico y fueron transportados refrigerados al laboratorio dentro de las 2 horas posteriores a la faena. El diámetro folicular se midió con un calibre y solo se aspiraron los folículos con un diámetro mayor a 10 mm. Se colectó el licor de cada folículo por aspiración con jeringas de insulina estériles. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta la centrifugación. También se colectaron muestras de medio MIV con 10% de SFB (n = 5). La concentración de Se fue determinada mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 200) con generador de hidruros.

Diseño experimental

Efecto del Se sobre la viabilidad de las células de cúmulus

En el experimento 1, se evaluó el efecto del Se sobre la viabilidad de las CC seguido de la adición de 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se al medio de MIV. Los COCs se maduraron

durante 24 h, y se evaluó la viabilidad como se mencionó anteriormente. Para este propósito, 512 COCs se maduraron en 5 réplicas y se analizaron al menos 200 CC por tratamiento en cada réplica.

Efecto del Se sobre la apoptosis

En el experimento 2, se determinó el efecto de la suplementación con Se al medio MIV (0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se) sobre la apoptosis de las CC mediante el ensayo de tinción con Anexina V. La MIV fue realizada como se describió anteriormente. Para este propósito, 400 COCs se maduraron en 4 réplicas.

Efecto del Se sobre la concentración total de glutatión

En el experimento 3, se evaluó el efecto de la adición de 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se al medio de MIV sobre la concentración intracelular de GSH-GSSG tanto en ovocitos como en CC. Tanto la maduración de los COCs como la determinación de la concentración de GSH se realizaron como se describió con anterioridad. Para este propósito, 320 COCs se maduraron en 4 réplicas.

Efecto del Se sobre la peroxidación lipídica

En el experimento 4, se evaluó el efecto del Se sobre los niveles de MDA seguido de la adición de 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se al medio de MIV utilizando la técnica de TBARS. Los COCs se maduraron por 24 h y los niveles de MDA se evaluaron como se describió anteriormente. Para este propósito, 320 COCs se maduraron en 4 réplicas.

Efecto del Se sobre el estatus antioxidante total

En el experimento 5, se evaluó el efecto de la suplementación con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se al medio de MIV sobre el EAT en COC. Los COCs se maduraron por 24 h y el EAT se evaluó como se describió anteriormente. Para este propósito, 320 COCs se maduraron en 4 réplicas.

Efecto del Se sobre la maduración nuclear de ovocitos

En el experimento 6, se evaluó el efecto de la suplementación con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se al medio de MIV sobre la maduración nuclear de los ovocitos. La MIV se realizó como se describió anteriormente. Para este propósito, 357 COCs se maduraron en 5 réplicas.

Efecto del Se sobre el desarrollo embrionario posterior

En el experimento 7, se investigó la capacidad de desarrollo de ovocitos madurados en medio MIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se. La MIV, FIV y CIV se realizaron como se describió previamente. Para este propósito, 1336 COCs se maduraron en 8 réplicas.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio en bloques. El modelo estadístico incluyó el efecto aleatorio del bloque (réplicas; $n = 4-8$) y el efecto fijo del tratamiento (0 vs 10 vs 50 vs 100 ng/ml de Se). La viabilidad de las CC; la apoptosis de las CC, la maduración nuclear; y las tasas de clivaje, blastocistos y eclosión se analizaron con una regresión logística utilizando el procedimiento GENMOD (SAS Institute), mientras que el GSH total

y el TBARS fueron analizados con una distribución gamma, utilizando el procedimiento GLIMIX (SAS Institute). El análisis del EAT se realizó con un modelo lineal con el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos). Los resultados de GSH total, TBARS y EAT están expresados como media de los mínimos cuadrados \pm EEM. Los resultados de viabilidad de las CC; apoptosis de las CC; maduración nuclear; y las tasas de clivaje, blastocistos y eclosión están expresados como porcentajes. La significancia estadística se fijó en $P < 0,05$, mientras que se estableció como tendencia para la significancia estadística en $P \leq 0,10$.

RESULTADOS

Determinación de la concentración de Se en el licor folicular y medio de maduración

La concentración de Se en el licor folicular fue de $128,8 \pm 7,9$ ng/ml, mientras que en el medio MIV el Se no fue detectable.

Efecto del Se sobre la viabilidad

En el experimento 1, la viabilidad de las CC se incrementó cuando se agregó Se al medio de MIV en comparación al control (60,1; 64,1; 66,5 y 69,0 % para 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se respectivamente $P < 0,05$); a su vez, el agregado de 100 ng/ml de Se fue la concentración que produjo el mayor incremento en la viabilidad ($P < 0,05$).

Efecto del Se sobre la apoptosis

En el experimento 2, los resultados revelaron una disminución de las células apoptóticas tardías cuando los COCs se maduraron en presencia de Se ($P < 0,05$). El

porcentaje de células necróticas después de la MIV fue menor en las CC maduras con 100 ng/ml de Se comparado con aquellas maduras sin suplementar ($P < 0,05$). Además, el porcentaje de células no apoptóticas fue mayor cuando se agregaron 50 y 100 ng/ml de Se al medio de MIV ($P < 0,05$; Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Apoptosis en células del cúmulus maduras *in vitro* con distintas concentraciones de Selenio.

Suplementación con Se (ng/ml)	(n)	Vivas (%)	Apoptóticas tempranas (%)	Apoptóticas tardías (%)	Necróticas (%)
0 (Control)	600	68,6 ^a	1,8 ^a	19,5 ^a	10,0 ^a
10	600	67,5 ^a	2,3 ^a	14,6 ^b	15,5 ^b
50	597	74,3 ^b	1,3 ^a	15,5 ^b	8,7 ^a
100	599	76,7 ^b	2,5 ^a	15,0 ^b	5,6 ^c

Los COCs bovinos se incubaron en medio MIV suplementado con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se durante 24 h. La apoptosis se evaluó utilizando Anexina V-FLUOS– Ioduro de propidio (PI). Las CC se clasificaron como vivas (Anexina V-negativo/PI-negativo); apoptóticas tempranas (Anexina V-positivo/PI-negativo); apoptóticas tardías (Anexina V-positivo/PI-positivo), y necróticas (Anexina V-negativo/PI-positivo). Los datos se expresaron en porcentaje. Para este propósito, 400 COCs se maduraron en cuatro replicas. ^{a-c} Valores con diferente superíndice dentro de cada columna indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Efecto del Se sobre la concentración total de glutatión

En el experimento 3, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en la concentración intracelular de GSH-GSSG de ovocitos y CC cuando se maduraron con

50 o 100 ng/ml de Se. Sin embargo, la concentración intracelular de GSH-GSSG se incrementó con el agregado de 10 ng/ml de Se ($P < 0,05$; Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Concentración intracelular total de glutatión en ovocitos y células del cúmulus bovinos madurados con distintas concentraciones de Selenio.

	Suplementación con Se (ng/ml)			
	0	10	50	100
Ovocito GSH-GSSG (pmol/ovocitos)	5,98 ± 0,05 ^a	8,41 ± 0,04 ^b	5,99 ± 0,05 ^a	6,35 ± 0,04 ^a
Cúmulus GSH-GSSG (nmol/106 células)	0,76 ± 0,07 ^a	0,94 ± 0,07 ^b	0,73 ± 0,09 ^a	0,66 ± 0,09 ^a

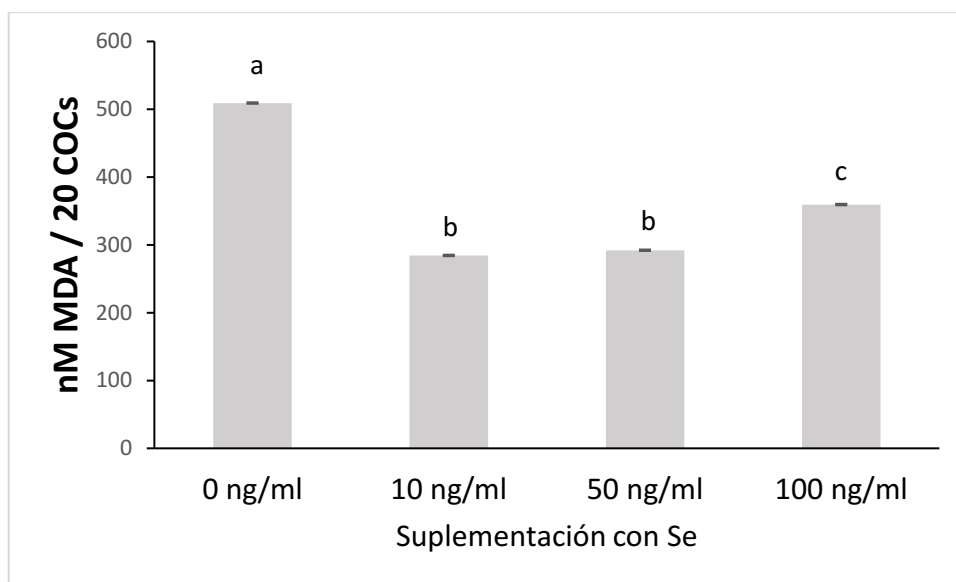
Los COCs bovinos se incubaron en medio MIV con 0, 10, 50 y 100 ng/ml durante 24 h. Los datos se expresaron como la media de los mínimos cuadrados ± EEM. Para este propósito, 320 COCs se maduraron en 4 réplicas.

^{a, b} Valores con diferente superíndice dentro de cada fila indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Efecto del Se sobre la peroxidación lipídica

En el experimento 4, los COCs madurados con Se presentaron una disminución significativa en los niveles de MDA respecto del grupo control ($P < 0,05$). Los niveles más bajos de MDA se observaron con 10 y 50 ng/ml de Se ($P < 0,05$; Figura 5.2).

Figura 5.2. Peroxidación lipídica en los complejos ovocitos-cúmulus madurados con diferentes concentraciones de Selenio.

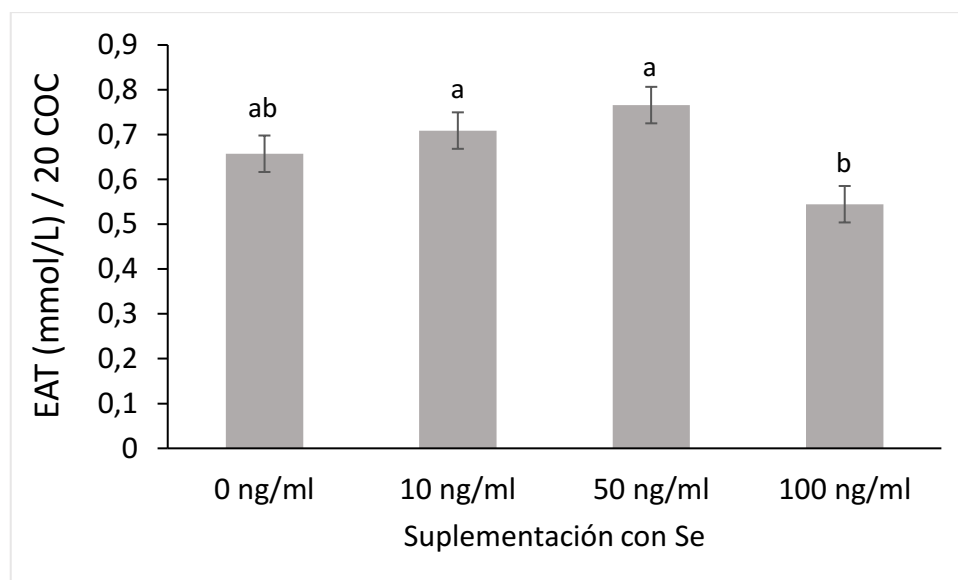


Los COCs bovinos se incubaron en medio MIV con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se durante 24 h. Los niveles de peroxidación lipídica se midieron utilizando el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y los resultados se expresaron como nmol MDA/20 COCs. Los datos se expresaron como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM (1,10 nM MDA/20 COCs). Para este propósito 320 COCs se maduraron en cuatro réplicas. ^{a-c} Barras con letras diferentes difieren estadísticamente ($P < 0,05$). MDA: Malondialdehido

Efecto del Se sobre el Estatus antioxidante total

En el experimento 5, el valor promedio de EAT de los COCs madurados con Se fue similar a aquellos del grupo control ($P > 0,05$). Sin embargo, los COCs madurados en 100 ng/ml de Se demostraron menor EAT que aquellos madurados en 10 y 50 ng/ml de Se ($P < 0,05$; Figura 5.3).

Figura 5.3. Estatus antioxidante total en complejos ovocito-cúmulus madurados con distintas concentraciones de Selenio.



Los COCs bovinos se incubaron en medio MIV con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se durante 24 h. El estatus antioxidante total se expresó como mmol/L. Los datos se expresaron como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM (0,04 mmol/L/20 COC). Para este propósito, 320 COCs se maduraron en cuatro réplicas. ^{a, b} Barras con letras diferentes difieren estadísticamente ($P < 0,05$). EAT: estatus antioxidante total.

Efecto del Se sobre la maduración nuclear de ovocitos

En el experimento 6, no se encontraron diferencias significativas en la maduración nuclear de los ovocitos madurados con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se ($P > 0,05$; Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Maduración nuclear de ovocitos bovinos madurados con diferentes concentraciones de Selenio.

	Suplementación con Se (ng/ml)			
	0 (Control)	10	50	100
Ovocito (<i>n</i>)	77	72	91	117
GV (%)	1,3	2,8	0,0	0,0
MI (%)	7,8	6,9	11,0	6,0
A-T (%)	0,0	0,0	0,0	0,9
MII+PB (%)	88,3	87,5	85,7	88,9
D (%)	2,6	2,8	3,3	4,3

Las diferencias entre los tratamientos dentro de cada categoría no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$). Los COCs bovinos se incubaron en medio MIV con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se durante 24 h. Los datos se expresaron como porcentajes. GV, vesícula germinal; M I, metafase I; A-T, anafase-telofase; M II + PB, metafase II y el primer corpúsculo polar; D, degenerado. Para este propósito, 357 COCs se maduraron en cinco réplicas.

Efecto del Se sobre el desarrollo embrionario posterior

En el experimento 7, no se encontraron diferencias en las tasas de clivaje y de blastocistos con el agregado de Se al medio de MIV ($P > 0,05$). Sin embargo, el agregado de 10 ng/ml de Se en el medio de MIV mejoró la tasa de eclosión ($P < 0,05$; Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos madurados con diferentes concentraciones de Selenio.

Suplementación con Se (ng/ml)	Ovocitos (n)	Clivados (%)	Blastocistos/ovocitos (%)	Blastocistos/clivados (%)	Eclosión/Blastocisto (%)
0 (Control)	321	77,25 ^a	25,54 ^a	30,39 ^a	47,56 ^a
10	365	75,06 ^a	27,67 ^a	36,76 ^a	64,35 ^b
50	316	77,53 ^a	20,56 ^a	26,75 ^a	50,76 ^{ab}
100	334	75,74 ^a	28,14 ^a	36,69 ^a	55,31 ^{ab}

Los COCs bovinos se incubaron en medio MIV con 0, 10, 50 y 100 ng/ml de Se durante 24 h. La tasa de clivaje se registró a las 48 h luego de la inseminación. Los datos reportados para el desarrollo hasta la etapa de blastocisto incluyeron aquellos embriones que progresaron a las etapas de blastocisto expandido o eclosionado después de 8 y 10 días en cultivo, respectivamente. Los datos se expresan como porcentaje. Para este propósito, 1336 COCs se maduraron en ocho réplicas. ^{a, b} Los valores con diferentes superíndices dentro de cada columna difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Recientemente, Xiong y col. (2018) reportaron que el contenido de Se en el licor folicular de *Bos grunniens* (una especie bovina salvaje) fue de 69 ± 3 ng/ml, mientras que, en el presente estudio, la concentración de Se fue dos veces mayor. Por lo tanto, la concentración de Se encontrada en el licor folicular de *Bos Taurus* fue similar a la concentración considerada como adecuada en el plasma. En el presente estudio, el medio de MIV sin Se o con concentraciones deficientes tuvo un efecto perjudicial sobre la viabilidad de las CC después de la maduración. De hecho, aunque la apoptosis en las CC fue significativamente disminuida cuando el Se fue agregado al medio de MIV, solo la

concentración considerada como adecuada fue capaz de reducir el porcentaje de células necróticas. Este hallazgo no coincide con lo reportado por Mauro y col. (2011), quienes observaron que la presencia de 5, 50, ó 500 ng/ml de Se en el medio de cultivo no modificó la viabilidad ni la apoptosis de las células HT29 con respecto al control. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con lo observado por Zou y col. (2019), quienes demostraron que el selenito de sodio incrementó la viabilidad y redujo la apoptosis y la necrosis de células epiteliales de glándula mamaria bovina (BMEC, por sus siglas en inglés) expuestas a estrés por calor. El rol antioxidante del Se, puede ser un mecanismo importante en el mantenimiento de la viabilidad celular y la prevención de la apoptosis. Ha sido demostrado que el selenito de sodio protege a las células embrionarias porcinas contra agentes oxidantes y la apoptosis (Uhm y col., 2007).

La importancia del Se en la defensa antioxidante celular ha sido ampliamente estudiada. Se ha demostrado que el Se puede ejercer su efecto beneficioso a través de selenoproteínas como la TrxR y la GPx (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013). Las enzimas TrxR reducen las proteínas tiorredoxinas aportando equivalentes reductores mediante el sistema redox de los tioles (Mustacich, 2000; Burk y Hill, 2015). Por otro lado, las GPx eliminan el peróxido de hidrogeno y los peróxidos lipídicos generados por los radicales libres y otras especies derivadas del oxígeno (Sunde, 1990). El MDA es considerado el principal producto de descomposición desprendido de los peróxidos lipídicos. Una correlación inversa entre el Se y el contenido de MDA en plasma ha sido reportada en mujeres embarazadas (Mihailović y col., 2000). En ratas con daño hepático inducido por nanopartículas de plata, el selenito de sodio elevó los niveles de GSH y la actividad de GPx, catalasa y superóxido dismutasa en hígado (Ansar y col., 2017). Recientemente, Ceko y col, (2015) demostraron en bovinos que el Se y la GPx1 están presentes en las células de la granulosa de los folículos

mayores y juegan un rol crítico como antioxidantes durante el desarrollo folicular tardío. Además, el cultivo de folículos preantrales de ratón en presencia de selenito de sodio incrementó la actividad de GPx y el EAT, mejorando el desarrollo folicular in vitro (Abdelahi y col., 2010). En nuestro estudio, la adición de Se al medio de MIV no modificó el EAT de los COCs, pero disminuyó los niveles de MDA con todas las concentraciones probadas, e incrementó a su vez, el contenido de GSH-GSSG cuando se lo suplementó en una concentración de 10 ng/ml.

Aunque actualmente no se conoce cuál es el órgano blanco del Se en el sistema reproductor femenino, es bien sabido que la deficiencia de este mineral provoca una reducción en la fertilidad (Basini y Tamanini, 2000). Paszkowski y col. (1995) encontraron una disminución significativa en los niveles de Se en el licor folicular de mujeres con infertilidad sin causa aparente. Según Basini y Tamanini, (2000), el Se no solo previene el daño oxidativo, sino que también puede influir en la expresión del receptor de FSH en las células de la granulosa. Además, estos investigadores demostraron que este mineral modula la proliferación de las células de la granulosa y la síntesis de estradiol (Basini y Tamanini, 2000). En 2012, Makki y col. demostraron que la adición de Se, calcio y calcio ionóforo al medio de MIV incrementó el porcentaje de ovocitos humanos en meiosis II, mientras que, en nuestro estudio, ni la maduración nuclear, ni la capacidad de desarrollo de los ovocitos se vio modificada por la suplementación con Se. No obstante, la suplementación de 10 ng/ml de Se en el medio de MIV incrementó la tasa de eclosión. Esto coincide con Shamsuddin y col. (1994) quienes reportaron que la suplementación con insulina, transferrina y Se durante la MIV y la FIV no modificó las tasas de clivaje y blastocistos en bovinos, pero incrementó la calidad de los blastocistos, exhibiendo una mejor viabilidad y supervivencia post-descongelamiento. En cerdos, Uhm y col. (2007) demostraron que la adición de selenito de

sodio al medio de CIV incrementó la tasa de desarrollo y la calidad de los partenotes. Un hallazgo interesante fue que la concentración de Se que mejoró la calidad embrionaria (tasa de eclosión) fue la misma que incrementó los niveles de GSH después de la MIV. En este sentido, ha sido reportado en la literatura una fuerte relación entre los niveles de GSH en el ovocito y el desarrollo embrionario temprano. Se ha demostrado que el contenido intracelular de GSH al final de la MIV refleja el grado de maduración citoplasmática del mismo, por lo que un incremento en las concentraciones de GSH durante la MIV mejora el desarrollo embrionario y la calidad del embrión (Funahashi y Day, 1995; Miyamura y col., 1995; de Matos y col., 1996; Furnus y col., 1998). No está claro por qué la concentración considerada como deficiente (10 ng/ml) fue la única que mejoró el contenido total de GSH. Una explicación podría ser que en este estudio el medio de MIV fue suplementado con Se en forma de selenito de sodio (sal inorgánica), mientras que *in vivo* este mineral es reducido e incorporado a proteínas principalmente en forma del aminoácido selenocisteína (Burk y Hill, 2015). El selenito sufre una reducción dependiente de tiol para formar seleniuro antes de ser incorporado a las selenoproteínas específicas, oxidando el GSH a GSSG (Batist y col., 1986; Stadtman, 1996). Esta reacción puede provocar el agotamiento de GSH debido a la exportación de GSSG celular a través de un transportador (Lee y Jeong, 2012). Shalini y Bansal (2007) demostraron que la adición de selenito de sodio en una concentración considerada como adecuada en el presente trabajo (alrededor de 118 ng/ml) disminuyó significativamente el contenido de GSH en células testiculares cultivadas *in vitro*.

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados demostraron que el agregado de Se durante la MIV, en concentraciones consideradas como marginales y adecuadas, incrementó la viabilidad de las CC, mientras que los niveles de lipoperoxidación en los COCs disminuyeron con todas las concentraciones estudiadas. Además, la suplementación con 10 ng/ml de Se incrementó el contenido intracelular de GSH-GSSG en CC y ovocitos y la tasa de eclosión de los embriones. Nuestros resultados sugieren que el Se podría actuar como un factor importante durante la MIV mejorando la capacidad antioxidante del COC bovino.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA, Davoodi D. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. *Hum Reprod.* 2010; 25:977-985. doi: 10.1093/humrep/deq002.
2. Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Sirini MA, Mattioli G, Picco SJ, Furnus CC. Effect of different manganese concentrations during in vitro maturation of bovine oocytes on DNA integrity of cumulus cells and subsequent embryo development. *Reprod Domest Anim.* 2013; 48:905-911. doi: 10.1111/rda.12184.
3. Ansar S, Alshehri SM, Abudawood M, Hamed SS, Ahamad T. Antioxidant and hepatoprotective role of selenium against silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12:7789-7797. doi: 10.2147/IJN.S136748.
4. Aréchiga CF, Vázquez-Flores S, Ortiz O, Hernandez-Cerón J, Porras A, McDowell LR, Hansen PJ. Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology.* 1999; 50: 65-76. doi: 10.1016/S0093-691X(98)00114-9.
5. Baker RD, Baker SS, Rao R. Selenium deficiency in tissue culture: implications for oxidative metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998; 27:387-392.
6. Basini G, Tamanini C. Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. *Domestic Animal Endocrinology.* 2000; 18:1-17. doi: 10.1016/S0739-7240(99)00059-4.

7. Batist G, Katki AG, Klecker RW, Myers CE. Selenium induced cytotoxicity of human leukemia cells: interaction with reduced glutathione. *Cancer Res.* 1986; 46:5482-5485.
8. Boland MP. Trace Minerals in Production and Reproduction in Dairy Cows. *Advances in Dairy Technology.* 2003; 15:319.
9. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830:3289-3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
10. Burk RF, Hill KE. Regulation of selenium metabolism and transport. *Annu. Rev. Nutr.* 2015; 35, 109-134.
11. Ceballos MA, Wittwer F. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch Med Vet.* 1996; 28: 5-18.
12. Ceko MJ, Hummitzsch K, Hatzirodos N, Bonner WM, Aitken JB, Russell DL, Lane M, Rodgers JR, Harris HH. X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function. *Metallomics.* 2015; 7:71-82. doi: 10.1039/c4mt00228h.
13. Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T, Mogas T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology.* 2010; 74:1341-1348. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.003.
14. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev.* 1996; 45:451-457. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q.

15. Fontenelle LC, Feitosa MM, Morais JBS, Severo JS, Freitas TEC, Beserra JB, Henriquez GS, Marreiro DN. The role of selenium in insulin resistance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 54. doi: 10.1590/s2175-97902018000100139.
16. Funahashi H, Day BN. Effect of cumulus cells on glutathione content of porcine oocytes during in vitro maturation. *J. Anim. Sci.* 1995; 73 (1): 90.
17. Furnus CC, de Matos DG, Moses DF. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev.* 1998. 51:76-83. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<76::AID-MRD9>3.0.CO;2-T.
18. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod.* 1994; 50:390-400.
19. Gerloff BJ. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 1992; 70:3934-3940.
20. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5:109-115.
21. Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U. Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 348:37-48. doi: 10.1006/abbi.1997.0335.

22. Hefnawy AEG, Tórtora-Pérez JL. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Res.* 2010; 89:185-192. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.12.042.
23. Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling pathway. *Biol Reprod.* 1997; 57:1484-1489.
24. Jeong YW, Hossein MS, Bhandari DP, Kim YW, Kim JH, Park SW, Lee E, Park SM, Jeong YI, Lee JY, Kim S, Hwang WS. Effects of insulin-transferrin-selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *Anim Reprod Sci.* 2008; 106:13-24. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.03.021.
25. Kommisrud E, Osterås O, Vatn T. Blood selenium associated with health and fertility in Norwegian dairy herds. *Acta Vet Scand.* 2005; 46:229-240.
26. Lee KH, Jeong D. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: the selenium paradox (Review). *Mol Med Rep.* 2012; 5:299-304. doi: 10.3892/mmr.2011.651.
27. Makki M, Saboori E, Sabbaghi MA, Aram R, Fallahian MH, Peyghambari F, Roustaei H, Ahmadi A. Effects of selenium, calcium and calcium ionophore on human oocytes in vitro maturation in a chemically defined medium. *Iran J Reprod Med.* 2012; 10:343-348
28. Mauro MO, Sartori D, Oliveira RJ, Lumi Ishii P, Mantovani MS, Ribeiro LR. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. *Mutat Res.* 2011. 715:7-12. doi: 10.1016/j.mrfm.2011.06.015.

29. Mehdi Y, Dufrasne I. Selenium in Cattle: A Review. *Molecules*. 2016; 21(4): 545. doi: 10.3390/molecules21040545.
30. Mihailović M, Cvetković M, Ljubić A, Kosanović M, Nedeliković A, Jovanović I, Pešut O. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biol Trace Elem Res*. 2000; 73:47-54. doi: 10.1385/BTER:73:1:47.
31. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Biol. Chem*. 1957; 229: 189-197.
32. Miyamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology*. 1995; 43 (1):282.
33. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem. J*. 2000; 346: 1-8. doi: 10.1042/bj3460001.
34. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod*. 2004; 71:1828-1837. doi: 10.1095/biolreprod.103.025627.
35. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 1986; 25:591-600.
36. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta*. 1995; 236:173-180.

37. Pehrson B, Hakkarainen J, Työppönen J. Nutritional muscular degeneration in young heifers. *Nord Vet Med.* 1986; 38:26-30.
38. Picco SJ, Anchordoquy JM, de Matos DG, Anchordoquy JP, Seoane A, Mattioli GA, Errecalde AL, Furnus CC. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2010; 74 (7):1141-1148. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.05.015.
39. Picco SJ, Rosa DE, Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Seoane A, Mattioli GA, Furnus CC. Effects of copper sulphate concentrations during in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2012; 77:373-381. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.08.009.
40. Raghu HM, Reddy SM, Nandi S. Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage in vitro in serum-free, semidefined media. *Veterinary Record.* 2002; 151:260-265. doi: 10.1136/vr.151.9.260.
41. Rivera RE, Christensen VL, Edens FW, Wineland MJ. Influence of selenium on heat shock protein 70 expression in heat stressed turkey embryos (*Meleagris gallopavo*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005; 142:427-432. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.09.006.
42. Schrauzer GN. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr.* 2000; 130:1653-1656. doi: 10.1093/jn/130.7.1653.
43. Shalini S, Bansal MP. Co-operative effect of glutathione depletion and selenium induced oxidative stress on API and NFkB expression in testicular cells in vitro: insights to regulation of spermatogenesis. *Biol Res.* 2007; 40:307-317 doi: S0716-97602007000400005.

44. Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H, Rodriguez-Martinez H. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology*. 1994; 41:1033-1043.
45. Singh AK, Rajak SK, Priyaranjan Kumar, Shilpi Kerketta Yogi RK. Nutrition and bull fertility: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2018; 6(6):635-643.
46. Smith KL, Hogan JS, Conrad HR. Selenium in dairy cattle: Its role in disease resistance. *Vet. Med.* 1988; 83:72-78.
47. Sordillo LM. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. *Vet Med Int*. 2013; 154045. doi: 10.1155/2013/154045.
48. Spears JW, Weiss WP. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J*. 2008; 176:70-76. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.015.
49. Stadtman TC. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65:83-100.
50. Sunde RA. Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr*. 1990; 10:451-474. doi: 10.1146/annurev.nu.10.070190.002315.
51. Süss U, Wüthrich K, Stranzinger G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol Reprod*. 1988; 38:871-880.
52. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*. 1972; 30:493-497.
53. Uhm SJ, Gupta MK, Yang JH, Lee SH, Lee HT. Selenium improves the developmental ability and reduces the apoptosis in porcine parthenotes. *Mol Reprod Dev*. 2007; 74:1386-1394. doi: 10.1002/mrd.20701.

54. Wichtel JJ. A review of selenium deficiency in grazing ruminants Part 1: New roles for selenium in ruminant metabolism. *N Z Vet J.* 1998; 46:2, 47-52, doi: 10.1080/00480169.1998.36055.
55. Xiong X, Lan D, Li J, Lin Y, Li M. Selenium supplementation during in vitro maturation enhances meiosis and developmental capacity of yak oocytes. *Anim Sci J.* 2018; 89:298-306. doi: 10.1111/asj.12894.
56. Zeng H. Selenium as an essential micronutrient: roles in cell cycle and apoptosis. *Molecules.* 2009; 14:1263-1278. doi: 10.3390/molecules14031263.
57. Zou Y, Shao J, Li Y, Zhao FQ, Liu JX, Liu H. Protective Effects of Inorganic and Organic Selenium on Heat Stress in Bovine Mammary Epithelial Cells. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019. [Consulta marzo 2019]. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/1503478/>.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

En conclusión, nuestros resultados indican que en la CDS más del 50% de los animales muestreados presentan algún grado de deficiencia, siendo los animales jóvenes los que poseen mayor riesgo de sufrirla. La carencia no se asociaría a una estación del año, siendo la ubicación geográfica la responsable de la variabilidad en el estatus de Se.

Los experimentos *in vivo* permitieron demostrar que la suplementación con Se puede reducir las pérdidas subclínicas de la carencia, como mermas en el crecimiento y la fertilidad. La suplementación de bovinos jóvenes con Se aumentó la GDP en terneros de cría predestete y durante el ingreso a confinamiento. En ambos casos la actividad de la enzima GPx se elevó desde niveles de deficiencia hasta valores de normalidad a los 28 y 21 días respectivamente. Por otro lado, el porcentaje de preñez en hembras adultas aumentó cuando se suplementó con Se al inicio de un protocolo de IATF.

Los ensayos *in vitro* destinados a evaluar el efecto de la suplementación con Se sobre la función reproductiva generaron resultados beneficiosos en gametas y embriones. Por un lado, el agregado de Se al medio FIV mejoró la calidad de los espermatozoides, aumentando su viabilidad, la integridad funcional de la membrana plasmática, el EA y el número de espermatozoides unidos a la ZP. Por otro lado, la suplementación con Se durante la MIV en concentraciones consideradas como marginales (50 ng/ml) y adecuadas (100 ng/ml) incrementó la viabilidad de las CC y redujo los niveles de lipoperoxidación en los COCs.

Además, la suplementación con 10 ng/ ml de Se incrementó el contenido intracelular de GSH-GSSG en las CC y ovocitos e incrementó la tasa de eclosión de los embriones.

En base a los resultados de este trabajo de tesis, podemos asumir que los bovinos de la CDS tienen riesgo de sufrir carencia de Se y pérdidas subclínicas, tanto productivas como reproductivas, asociadas a la misma. La suplementación con Se en una dosis de 0,1 mg/kg por vía SC demostró ser una herramienta de fácil implementación, que puede evitar las menores GDP en terneros y aumentar la fertilidad en la hembra bovina, incrementando al mismo tiempo la actividad de la enzima GPx durante un lapso aceptable. Finalmente, la suplementación con Se como selenito de sodio a los medios de cultivo *in vitro* demostró ser una buena herramienta para mejorar la maduración de los COCs y la calidad de los espermatozoides bovinos, posiblemente debido a su función en el balance redox celular.