

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

ESCUELA DE ZOOTECNIA

Suplementación con selenio orgánico y su efecto sobre el desempeño productivo y reproductivo de vacas lecheras en pastoreo

Jeffry Sánchez Salas

Tesis presentada para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería

Agronómica con énfasis en Zootecnia

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2012

Esta tesis fue aceptada por el siguiente Tribunal Evaluador de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia

Ing. Jorge Alberto Elizondo Salazar, Ph.D.

Director de Tesis

Ing. Evelio Víquez Matei, MII

Miembro del Tribunal

Jimena Rodríguez Aguilar, Licda.

Miembro del Tribunal

Ing. Michael López Herrera, Lic.

Miembro del Tribunal

Ing. Augusto Rojas Bourrillón, M.Sc.

Subdirector de Escuela

Ing. Jeffry Sánchez Salas

Sustentante

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones y oportunidades que me ha concedido.

A mis padres Ramón Sánchez Elizondo y María Salas Alfaro, y a papá Leonel (q.d.D.g.) por enseñarme el valor del trabajo y el esfuerzo para alcanzar las metas que me he propuesto.

A Marisol Rodríguez Alfaro y Carlos Orozco Vidaorreta por su valioso apoyo.

AGRADECIMIENTO

A mi tutor Jorge Elizondo Salazar y miembros del tribunal examinador Augusto Rojas Bourrillón, Evelio Víquez Matei, Jimena Rodríguez Aguilar y Michael López Herrera.

A Ricardo Gurdián Marchena y Mariliz Gurdián Heinsohn propietarios de la Hacienda Terranova y a sus colaboradores Fabián Jiménez Molina, Luis Salazar Navarro, Marvin Mejía Segura, Maximiliano Mesén Carmona, Michael Rojas Rodríguez y Minor Román Vega.

A Alejandro Romero Herrera, Alfredo Ruh Guevara, Andrea Brancalião Malaguido, Juan Gómez Basauri y Oscar Calderón Cortés de Alltech.

A Adriana Brizuela Monge, Armando Zúñiga Rodríguez, César Herrera Fallas, Gonzalo Carmona Solano, Geovanni Arroyo Quesada, Gustavo Ortiz Meseguer, Luis Noguera Solera, Ricardo Rivera Poveda y Sandra Quirós Rojas de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L.

A Julio Murillo Barrantes de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional por las valoraciones reproductivas.

A Juvenal Feoli Fonseca del Centro Integral Médico por la determinación de Glutatión peroxidasa.

A Leonor Rodríguez Montero de Asesorías Químicas y Laboratorio Químico (AQYLASA) por la determinación de selenio.

A Águeda Serrano Zúñiga y Carlos Arroyo Oquendo de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Costa Rica.

A todos ellos el más sincero agradecimiento por la colaboración brindada durante la ejecución de la presente investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Nutrición mineral del ganado lechero.....	3
Distribución y biosíntesis del selenio en el suelo y las plantas	4
El rol del selenio: Componente de selenoproteínas.....	9
Absorción y metabolismo de selenio en humanos y animales.....	13
Selenio en los rumiantes.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Diseño experimental y manejo.....	25
Procedimientos de muestreo y mediciones	27

Estimación del consumo de materia seca y análisis en alimentos	27
Producción y composición láctea	27
Análisis de selenio.....	28
Hematología y química sanguínea	28
Evaluación reproductiva	29
Análisis estadístico	29
OBJETIVOS.....	31
General	31
Específicos.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
Consumo voluntario, producción y composición láctea	32
Contenido de selenio en leche.....	34
Actividad de la Glutación peroxidasa.....	41
Parámetros de fertilidad	45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
LITERATURA CITADA.....	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Concentración de Se en muestras de suelo de diferentes localidades de Costa Rica.....	5
2	Principales selenoproteínas y su rol en el mantenimiento de la homeostasis en mamíferos	11
3	Efecto de la fuente de Se sobre distintos parámetros en el ganado lechero reportado en diferentes investigaciones	18
4	Efecto de la fuente y dosis de suplementación de Se sobre el contenido de Se en leche reportado en diferentes investigaciones.....	22
5	Composición nutricional de los ingredientes que componen la dieta basal de las vacas en el estudio.....	26
6	Efecto de la suplementación post-parto con selenolevadura sobre la producción y composición láctea de vacas lecheras en pastoreo	33
7	Concentración de Se en muestras de leche de diferentes localidades de Costa Rica.....	41
8	Estimación del CMS, concentración y consumo de Se durante el período experimental	43
9	Efecto de la suplementación post-parto con selenolevadura sobre el contenido de Hb, la actividad de la GSH-Px y la concentración de Se en sangre de vacas lecheras en pastoreo ..	43
10	Efecto de la suplementación post-parto con selenolevadura sobre parámetros de fertilidad de vacas lecheras en pastoreo	46

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vías biosintéticas para el metabolismo del Se en las plantas	8
2	Vías metabólicas del Se dietético en humanos y animales.....	14
3	Efecto de la suplementación post-parto con selenolevadura sobre a) la concentración y b) la excreción de Se de vacas lecheras en pastoreo.....	35
4	Efecto del incremento en el consumo total de Se post-parto sobre a) la concentración y b) la excreción de Se en leche de vacas lecheras en pastoreo	36
5	Incremento relativo en la concentración de Se en leche de vacas lecheras suplementadas con selenolevadura respecto a una fuente inorgánica reportado en diferentes investigaciones ...	37
6	Relación entre la concentración de a) Se absorbible y b) Se total y la concentración de Se en leche de vacas lecheras en pastoreo	39
7	Relación entre el consumo de a) Se absorbible y b) Se total y la concentración de Se en leche de vacas lecheras en pastoreo	39
8	Incremento relativo en la concentración de Se en sangre de vacas lecheras suplementadas con selenolevadura respecto a una fuente inorgánica reportado en diferentes investigaciones ...	44

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS	Conteo de Células Somáticas
CMS	Consumo de Materia Seca
Cys	Cisteína
EE	Extracto Etéreo
EEM	Error Estándar de la Media
EN _l	Energía Neta de Lactancia
FDA	Fibra Detergente Ácida
FDN	Fibra Detergente Neutra
GSH-Px	Glutación Peroxidasa
Hb	Hemoglobina
ID	Iodotironina Deiodinasa
LCE	Leche Corregida por Energía
Met	Metionina
MS	Materia Seca
Na-Sel	Selenito o Selenato de Sodio
PC	Proteína Cruda
RTM	Ración Total Mezclada
Se	Selenio
SeCys	Selenocisteína
SeMet	Selenometionina
TRx	Tiorredoxina
TRx-R	Tiorredoxina reductasa

RESUMEN

El presente estudio fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto de la suplementación con Se orgánico sobre el desempeño productivo y reproductivo de vacas lecheras en pastoreo. Cuarenta vacas Holstein multíparas al momento del parto fueron asignadas aleatoriamente a 2 grupos, todas las vacas consumieron la misma dieta basal que ofreció una concentración de Se que varió entre 0,67-0,72 mg·kg MS⁻¹. Veinte de las vacas fueron suplementadas diaria e individualmente con 3 mg adicionales de selenolevadura producida a partir de la *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060 (Sel-Plex, Alltech Biotechnology, Nicholasville, KY), desde el día 5 hasta el día 56 post-parto para una concentración de Se en la dieta que osciló entre 0,80 y 0,91 mg·kg MS⁻¹. La suplementación con selenolevadura no afectó significativamente el CMS, la producción y composición láctea, ni el CCS. Sin embargo, la suplementación con selenolevadura demostró una mayor eficacia de esta fuente para incrementar el nivel de Se en las vacas, pues la actividad de la enzima GSH-Px y la concentración de Se en sangre fueron numéricamente mayores en las vacas suplementadas con selenolevadura respecto al grupo Control (11%) mientras que la concentración de Se en leche fue significativamente mayor en las vacas suplementadas respecto al grupo Control (20,5 vs. 12,7 µg·L⁻¹), representando un incremento de 61%, causado por una mayor transferencia del mineral a la leche (9,9 vs. 7,9%). A su vez, incrementos en el nivel de inclusión de selenolevadura mostraron un efecto lineal positivo, pudiendo representar alrededor de 9 µg·L⁻¹ más por cada mg de Se consumido respecto al grupo Control. La suplementación con selenolevadura no afectó significativamente los parámetros de fertilidad; no obstante, las vacas suplementadas mostraron un mayor desarrollo folicular que pudo haber repercutido en un menor intervalo parto concepción (100 vs. 111 días), lo que podría implicar una retribución de \$8 por vaca.

INTRODUCCIÓN

El selenio (Se) es considerado uno de los elementos trazas más controversiales, pues a pesar de que es tóxico a dosis elevadas, su deficiencia se ha convertido en un problema global a causa de su esencialidad para un adecuado funcionamiento del organismo, ya que es un componente estructural de la enzima Glutación Peroxidasa (GSH-Px) y de otras selenoproteínas involucradas en la protección antioxidante (Lyons *et al.* 2007).

En los últimos años, se ha demostrado que los suelos generalmente tienen una baja concentración de Se, haciendo que los forrajes y cultivos que crecen en ellos provean cantidades inadecuadas del mineral, generando un incremento en la susceptibilidad a enfermedades y una disminución del desempeño productivo y reproductivo de los animales (Ceballos *et al.* 2009).

Esto ha ocasionado que el nivel de este elemento en los alimentos de origen animal para el consumo humano varíe entre regiones. Por ejemplo, la Comisión Intersectorial de Guías Alimentarias para Costa Rica (CIGA 2007) ha considerado al Se como un nutriente emergente por su relación con la prevención de enfermedades crónicas. Recientemente, la Encuesta Nacional de Nutrición evidenció que el 35% de la población adulta costarricense presenta deficiencias de Se al manifestar niveles séricos del elemento inferiores a $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ministerio de Salud 2010).

Una alternativa potencialmente efectiva para mejorar el nivel de consumo del Se en la población humana es a través de leche enriquecida con este mineral, puesto que la suplementación de vacas lecheras con Se orgánico ha incrementado considerablemente la concentración de Se en este alimento (Givens *et al.* 2004, Juniper *et al.* 2006, Heard *et al.* 2007).

En este sentido, los productos lácteos podrían fungir como alimentos funcionales que permitan alcanzar las recomendaciones dietéticas diarias recomendadas para humanos y con esto promover una buena salud y ayudar a solventar problemas relacionados con la deficiencia de este nutriente (Doyle *et al.* 2011).

Por esta razón, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la suplementación con selenio orgánico sobre el desempeño productivo y reproductivo de vacas lecheras en pastoreo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Nutrición mineral del ganado lechero.

La nutrición aplicada del ganado lechero puede ser definida ampliamente como la selección y el uso de los componentes de los alimentos para suplir las cantidades adecuadas y el balance de nutrientes requeridos para los procesos de mantenimiento, crecimiento, reproducción, lactación y salud, que conjuntamente conducen a un óptimo desempeño del animal (Eastridge 2006, Drackley *et al.* 2006).

Los minerales forman parte de esos nutrientes requeridos. Son al menos 17 los elementos que el ganado lechero demanda en su dieta. Los que son requeridos en mayores cantidades se conocen como macrominerales y en este grupo se incluye al calcio, fósforo, sodio, cloro, potasio, magnesio y azufre, los cuales son importantes constituyentes del hueso y otros tejidos, así como de los fluidos corporales (NRC 2001).

Mientras que el grupo de los minerales que se requiere en menor proporción se conoce como trazas e incluye al cobalto, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, zinc, cromo y flúor. Éstos están presentes en los tejidos corporales en muy pequeñas cantidades y por lo general sirven como componentes de metaloenzimas, cofactores enzimáticos o de hormonas del sistema endocrino (NRC 2001).

La importancia de prevenir la deficiencia de estos últimos ha sido ampliamente reconocida, pues ésta puede resultar en un detrimento en el funcionamiento de los procesos fisiológicos de los que forman parte. Asimismo, debido a que la productividad animal continúa incrementándose, ha crecido el interés en mejorar las estrategias de alimentación mineral (Rabiee *et al.* 2010).

Parte de ese interés, radica en el uso de minerales orgánicos en las dietas, pues a pesar de que el ganado lechero suele ser suplementado con minerales en forma de sales inorgánicas, numerosos estudios han confirmado una mejoría en el desempeño animal al ofrecer minerales orgánicos. Esto puede estar relacionado a un incremento en la disponibilidad de estos minerales, por lo que la cantidad ofrecida al ganado lechero podría ser reducida, manteniendo el desempeño y reduciendo potencialmente la excreción al ambiente (Nocek *et al.* 2006).

Entre los minerales traza más comúnmente estudiados se encuentra el Se. A la fecha, diversas investigaciones han brindando un mejor entendimiento sobre su disponibilidad en diferentes fuentes o su transferencia a la sangre y la leche por ejemplo.

Distribución y biosíntesis del selenio en el suelo y las plantas.

El Se es un elemento químico de número atómico 34 y peso atómico 78,96. Pertenece al grupo VI de la tabla periódica de los elementos, mismo grupo que también aloja algunos no metales como el azufre y el oxígeno. El ciclo del Se en la

cadena alimenticia inicia desde el suelo con la captura del mineral por parte de las plantas, cuya asimilación depende de factores como el pH del suelo, el potencial de oxidación-reducción, la composición mineral del suelo y la precipitación (Lyons *et al.* 2007).

En efecto, los suelos son la mayor fuente de Se para las plantas y por ende para los humanos y animales que las consumen; sin embargo, el contenido de Se en los suelos varía significativamente entre regiones, encontrándose entre 0,1 y 2,0 mg·kg⁻¹ (Tapiero *et al.* 2003). En el caso de Costa Rica, León *et al.* (1994) reportaron concentraciones de Se en suelo que oscilaron entre 0,7 y 4,2 mg·kg⁻¹ (Cuadro 1) mientras que en forrajes Vargas *et al.* (1992) obtuvieron contenidos de Se que fluctuaron entre 0,05 y 0,19 mg·kg MS⁻¹.

Cuadro 1. Concentración de Se en muestras de suelo de diferentes localidades de Costa Rica.

Procedencia	Número de muestras	Ámbito de Concentración (mg·kg ⁻¹)	
		Máximo	Mínimo
Cartago (Pacayas)	9	3,40 ± 0,20	1,07 ± 0,01
Cartago (Volcán Irazú)	5	1,31 ± 0,04	ND
Alajuela (San Carlos)	12	4,05 ± 0,05	0,68 ± 0,07
Alajuela (Carrizal)	6	1,90 ± 0,02	ND
Heredia (Los Cartagos)	3	4,20 ± 0,70	ND
San José (Puriscal)	8	0,83 ± 0,09	ND

ND = No Detectado.

Fuente: León *et al.* 1994.

En este sentido, diversas partes del mundo han sido identificadas con bajos contenidos de Se en el suelo. Las regiones volcánicas y los suelos ácidos son particularmente susceptibles a la lixiviación mineral y a la formación de complejos insolubles con hierro y aluminio, haciendo al Se pobremente disponible para las plantas (NRC 1983, Tapiero *et al.* 2003).

Asimismo, a pesar de que en suelos alcalinos el Se se encuentra en una forma soluble y fácilmente disponible para las plantas denominada selenato (SeO_4^{2-}), encuentra en el sulfato (SO_4^{2-}), un competidor para su absorción pues utilizan el mismo medio de transporte, por lo que altos niveles de SO_4^{2-} en el suelo también disminuye la absorción del Se por parte de las plantas (Terry *et al.* 2000, Lyons *et al.* 2007).

Básicamente, la biosíntesis y metabolismo del Se en las plantas es un proceso que consiste en la translocación del SeO_4^{2-} o selenito (SeO_3^{2-}) del suelo para sintetizar los selenoaminoácidos selenometionina (SeMet) principalmente y selenocisteína (SeCys) en una pequeña cantidad, los cuales son incorporados en las proteínas como análogo de los aminoácidos azufrados metionina (Met) y cisteína (Cys), respectivamente (Figura 1; Tapiero *et al.* 2003, Rayman *et al.* 2008).

Además de la SeCys, otros compuestos como Se-metil-selenocisteína (MeSeCys) y γ -glutamil-Se-metil-selenocisteína (γ -GMeSeCys), ambos

considerados productos desintoxicadores, no son incorporados de manera significativa en la proteína vegetal, sin importar el nivel de Se en el suelo. A su vez, las plantas pueden volatilizar cantidades significativas de Se como dimetilseleniuro (no acumulador) y dimetilseleniuro (acumulador) (Terry *et al.* 2000, Rayman *et al.* 2008).

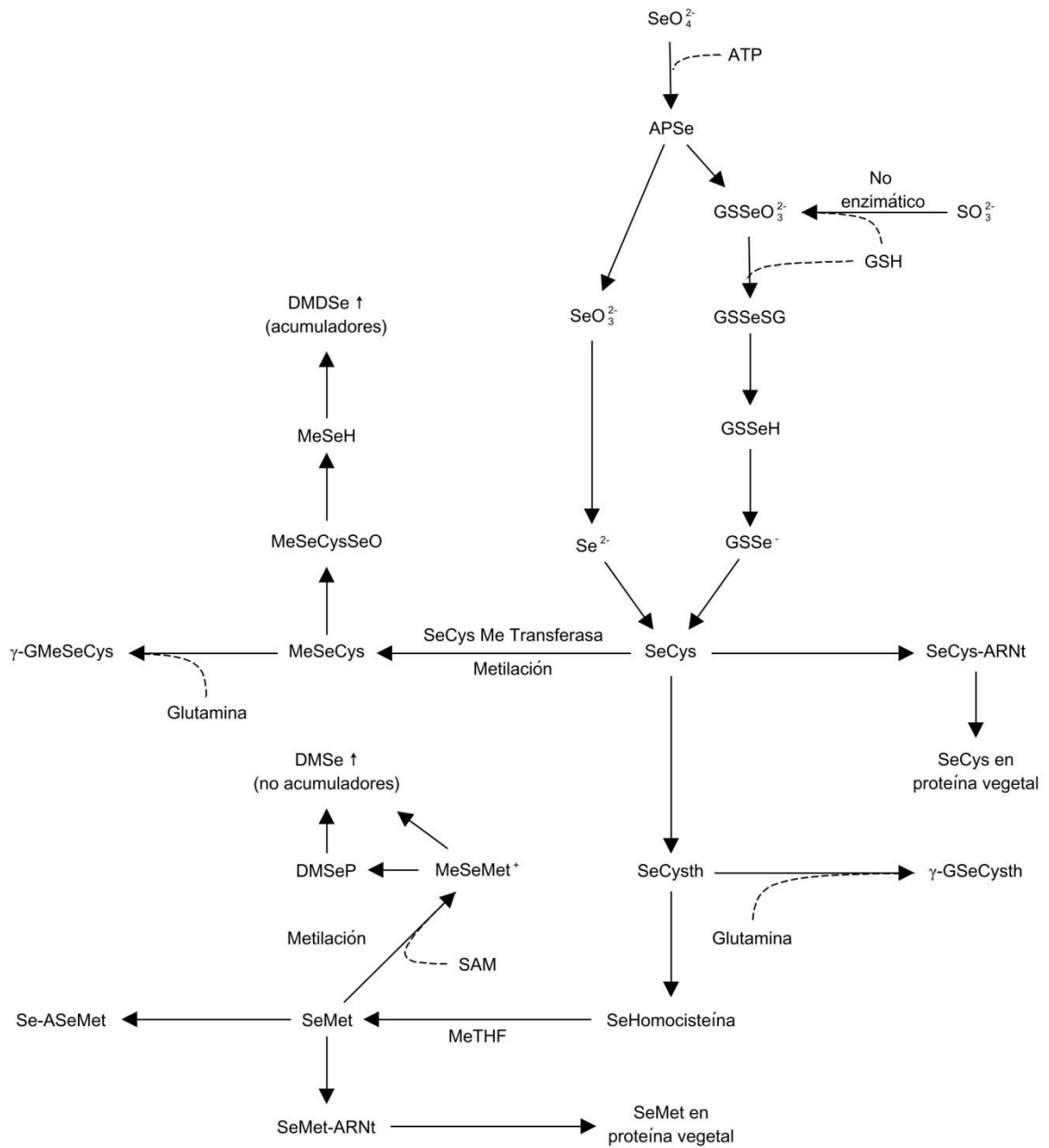


Figura 1. Vías biosintéticas para el metabolismo del Se en las plantas (Adaptado de Rayman *et al.* 2008).

El rol del selenio: Componente de selenoproteínas.

El sustento básico para definir el rol del Se como micronutriente esencial en la nutrición diaria de los mamíferos fue demostrada por Schwarz y Foltz (1957) quienes descubrieron que ratas con deficiencia de Se podrían padecer necrosis hepática. No obstante, fueron Rotruck *et al.* (1973) y Flohé *et al.* (1973) quienes lograron atribuir los efectos beneficiosos del Se a una función bioquímica, al ser un componente esencial de una importante enzima antioxidante o selenoproteína conocida como GSH-Px.

El progreso reciente en la investigación del Se ha permitido expandir el espectro de sus funciones fisiológicas. A la fecha existen al menos 18 selenoproteínas conocidas; sin embargo, hay evidencia que sugiere la existencia de aproximadamente 22 a 25 selenoproteínas (Himeno e Imura 2000, Hatfield y Gladyshev 2003, Kryukov *et al.* 2003). A las selenoproteínas conocidas se les han atribuido numerosas funciones y han sido organizadas en distintos grupos. No obstante, la labor de algunas de ellas aún se desconoce y se les ha denominado huérfanas (Cuadro 2).

En los que respecta a la GSH-Px, su principal rol fisiológico es mantener apropiadamente bajos los niveles de peróxido de hidrógeno dentro de la célula, proveyendo una segunda línea de defensa contra los hidroperóxidos que pueden dañar las membranas y otras estructuras de la célula. Esto lo logra actuando

sinérgicamente con el α -tocoferol en la regulación de la peroxidación lipídica y disminuyendo así el daño potencial causado por radicales libres (Rotruck *et al.* 1973).

Se reconocen 4 isoformas de esta selenoproteína, a saber: la GSH-Px1 o citoplasmática que es la más abundante al expresarse en todo tipo de células, por lo que se ha considerado una de las mayores enzimas antioxidantes, la GSH-Px2 o gastrointestinal, la GSH-Px3 o plasmática y la GSH-Px4 o fosfolipídica. Esta última reduce específicamente los ácidos grasos hidroperóxidos esterificados a fosfolípidos, razón por la cual parece tener un papel más importante en la protección de las membranas contra la peroxidación lipídica (Himeno e Imura 2000).

Por su parte, la Tiorredoxina reductasa (TRx-R) es otra selenoproteína que se encarga de reducir la forma oxidada de la Tiorredoxina (TRx), una proteína de bajo peso molecular facultada para reducir los disulfuros de proteínas y otras moléculas oxidadas, que a su vez estimula la proliferación tanto de células normales como tumorales. El sistema TRx-TRxR juega un papel importante en la regulación redox de varios eventos celulares que incluyen la activación de factores de transcripción y la protección contra el daño oxidativo (Nakamura *et al.* 1997).

Cuadro 2. Principales selenoproteínas y su rol en el mantenimiento de la homeostasis en mamíferos.

Selenoproteína	Funciones
Glutación peroxidasas (GSH-Px)	
GSH-Px1 (citoplasmática)	Reduce las moléculas reactivas, radicales libres y virulencia; Complementa la acción de la vitamina E
GSH-Px2 (gastrointestinal)	Antiapoptótico en las criptas del colon; Mantiene la integridad de la mucosa intestinal
GSH-Px3 (plasmática)	Transporta Se; Protege la tiroides del peróxido de hidrógeno en los tirocitos y el lumen folicular
GSH-Px4 (fosfolipídica)	Reduce los hidroperóxidos y colesterol oxidado a fosfolípidos; Necesaria para la maduración y viabilidad espermática
Iodotironina deiodinasas (ID)	
ID1 (tiroidea, hepática, renal)	Convierte la Tiroxina (T_4) a Triyodotironina (T_3)
ID2 (cerebral, muscular)	Convierte la T_4 a T_3 y la Triyodotironina reversa (rT_3) a Diyodotironina (T_2)
ID3 (cerebral, placentaria)	Antioxidante en el cerebro; Convierte la T_3 a rT_3 y la rT_3 a T_2 ; Protege al feto de la sobrexposición a T_3

Cuadro 2. Principales selenoproteínas y su rol en el mantenimiento de la homeostasis en mamíferos
(continuación).

Tiorredoxina reductasas (TrxR)

TrxR1 (citoplasmática)	Reduce los tioles proteicos y la TRx; Provee equivalentes reductores a sistemas redox dependientes; Reduce de la expresión del crecimiento de células tumorales
TrxR2 (mitocondrial)	Reduce los tioles proteicos y la TRx; Provee equivalentes reductores a sistemas redox dependientes; Indispensable para la viabilidad de los cardiomiocitos
TrxR3 (testicular)	Reduce los tioles proteicos y la TRx; Provee equivalentes reductores a sistemas redox dependientes

Otras selenoproteínas

Selenoproteína N	Regula la movilización del calcio requerido para el desarrollo temprano del músculo
Selenoproteína P	Actividad antioxidante; Transporta Se
Selenoproteína R	Actividad antioxidante y antienvjecimiento
Selenoproteína S	Protege a las células del retículo endoplasmático del estrés por la apoptosis; Relacionada con el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad de la insulina
Selenoproteína 15 kDa	Puede afectar el plegamiento de la glicoproteína
Selenofosfato sintetasa-2	Biosíntesis de SeCys utilizada en la síntesis de selenoproteínas

Fuente: Rotruck *et al.* 1973, Low *et al.* 1995, Kryukov *et al.* 2003, Rayman 2012.

En este sentido, una posible deficiencia de Se implica una limitada expresión de las selenoproteínas relacionadas con la producción antioxidante y la regulación redox, misma que puede manifestarse en un gran número de problemas como necrosis hepática, distrofia muscular, microangiopatía, diátesis exudativa, fibrosis pancreática, retención de placenta, mastitis, ovarios quísticos, crecimiento deficiente, enfermedad de Keshan, enfermedad de Kashin-Beck, cáncer, enfermedades cardíacas, inmunidad deficiente, fecundidad reducida, entre otros que pueden afectar a humanos y animales domésticos (Edens 1996, Tapiero *et al.* 2003).

Es importante notar que, la suplementación de Se en humanos y animales domésticos deficientes en Se restaura la expresión de las selenoproteínas, conduciendo a la recuperación de la habilidad protectora contra el daño oxidativo (Himeno e Imura 2000).

Absorción y metabolismo del selenio en humanos y animales.

Diversas investigaciones en la bioquímica del Se han proveído una mejor comprensión en lo referente a su metabolismo y a su vez han permitido establecer diferencias para clasificar las fuentes de Se en inorgánicas (SeO_3^{2-} o SeO_4^{2-}) u orgánicas (SeMet o SeCys).

Las selenoproteínas mamíferas contienen Se en forma del aminoácido SeCys; sin embargo, para su incorporación es necesaria la generación de un

metabolito central de Se denominado selenuro de hidrógeno (H_2Se) y exponerlo a la presencia de agentes reductores para que sea convertido en selenofosfato ($HSePO_3^{2-}$) por acción de la enzima selenofosfato sintetasa. Este $HSePO_3^{2-}$ actuará con residuos de serina ligados a un ARNt específico (codón UGA) para generar el complejo $SeCys-ARNt_{UGA}$, el cual es colocado en el sitio apropiado durante la síntesis de dichas selenoproteínas (Figura 2; Burk 1991, Weiss 2005).

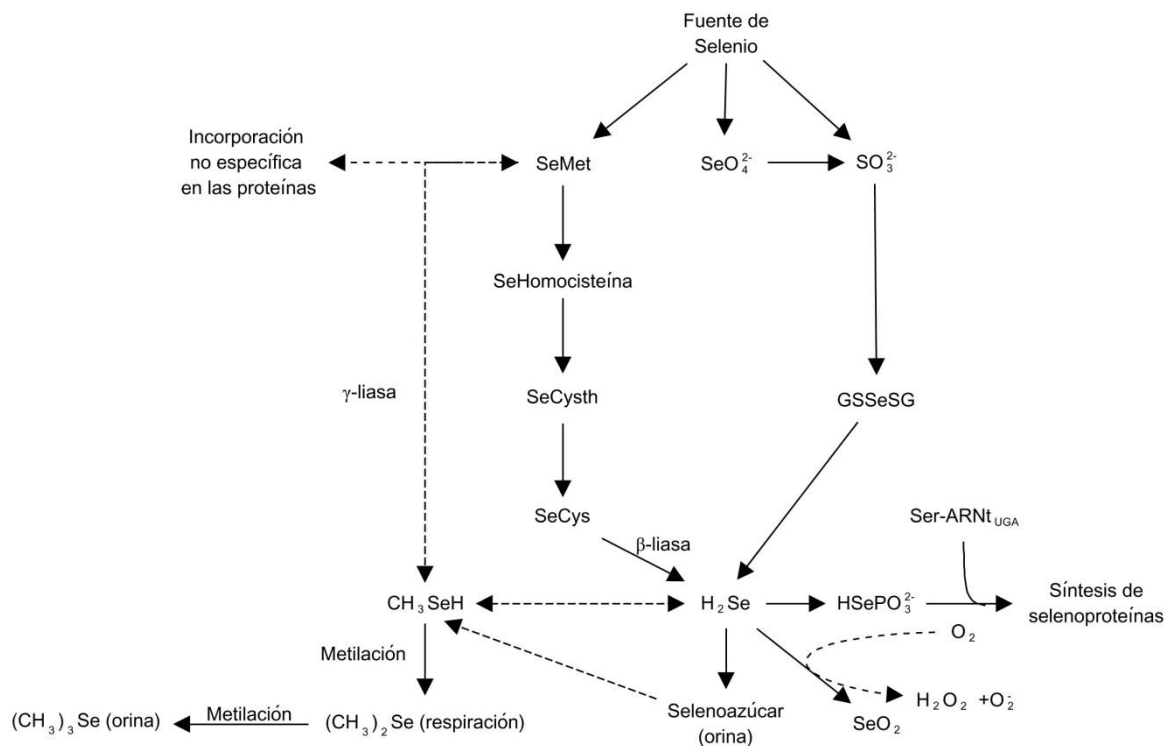


Figura 2. Vías metabólicas del Se dietético en humanos y animales (Adaptado de Suzuki 2005, Rayman *et al.* 2008).

En el caso de las fuentes de Se inorgánico (SeO_3^{2-} o SeO_4^{2-}), la generación del H_2Se es un proceso sencillo, que únicamente requiere de condiciones reductoras y la interacción con el tripéptido GSSeSG. Sin embargo, con el Se

orgánico (SeMet o SeCys) el mecanismo es más complejo pues la SeMet debe someterse a un proceso de trans-selenación para generar SeCys o debe existir SeCys libre para que reaccione con la SeCys β -liasa, causando la liberación del H_2Se . Adicionalmente, la SeMet también puede someterse a la acción de la γ -liasa para formar metil selenol (CH_3SeH), debido a que puede ser desmetilado a H_2Se (Suzuki 2005, Okuno *et al.* 2001).

En tanto, el Se sobrante en forma de H_2Se es transformado a metabolitos metilados para su excreción por la orina tal es el caso del selenoazúcar (1 β -metilseleno-N-acetil-D-galactosamina) y el ion trimetil selenonio ($(CH_3)_3Se^+$) o exhalado en la respiración como ocurre con el dimetil seleniuro ($(CH_3)_2Se$; Francesconi y Pannier 2004).

Ante esto, Daniels (1996) ha postulado que existen dos distintos depósitos metabólicos de Se en el cuerpo. El principal depósito incluye todas las formas de Se derivadas de una fuente inorgánica, es decir, selenoproteínas, metabolitos y varios otros productos intermediarios de este proceso. Este es un depósito activo provisto para la síntesis de importantes selenocompuestos funcionalmente primarios mientras que el segundo depósito consiste en proteínas que contienen SeMet y que potencialmente pueden contribuir al primero participando en la síntesis de selenoproteínas.

Esto indica que la SeMet es una forma no específica de Se, la cual constituye parte del almacén de Met y es distribuida aleatoriamente sin ser afectada por procesos metabólicos específicos del Se sino que es absorbida por un mecanismo activo, utilizando el mismo sistema de transporte enzimático que la Met, puesto que las células no diferencian entre una y otra, razón por la que esta fuente puede considerarse como una forma de almacenamiento de Se en los músculos (Burk *et al.* 2001, Reilly 2006).

Está claro que el desarrollo de una reserva de Se podría ser un importante mecanismo regulatorio para mantener una efectiva defensa antioxidante durante períodos donde la demanda de Se incrementa, como en condiciones de estrés por ejemplo. En este momento, el catabolismo de proteínas puede liberar SeMet como fuente de Se para la nueva síntesis de selenoproteínas. Por lo que desde un punto de vista nutricional, la fuente de Se orgánica podría considerarse superior a la inorgánica (Ip y Hayes 1989).

Selenio en los rumiantes.

Debido a la variabilidad en los niveles de Se en los suelos y que su disponibilidad para las plantas depende de distintos factores previamente descritos, una práctica común en el mundo incluye la suplementación de Se en las dietas de los rumiantes, ya que, los ingredientes de las dietas para rumiantes no

son adecuados para alcanzar la alta demanda de Se para crecimiento, reproducción y lactación (Lyons *et al.* 2007).

Particularmente, en el ganado lechero la suplementación con 0,3 mg de Se·kg MS⁻¹ se considera adecuada y usualmente mantiene las concentraciones plasmáticas de Se dentro de los rangos normales (20-30 µg·L⁻¹; Pehrson 1993). La práctica más común consiste en la suplementación con Se en su forma inorgánica; sin embargo, el remplazo de dicha fuente por Se orgánico ha sido probado como un medio efectivo de solventar los problemas de Se en el ganado lechero, incluyendo incrementos en la concentración de Se en sangre y la actividad de la GSH-Px, la transferencia del Se al calostro y a la leche, obteniéndose como resultado una mejora en la salud y la productividad animal (Cuadro 3; Maus *et al.* 1980, NRC 2001).

Algunos experimentos que han comparado las fuentes de Se, fueron recopilados por Weiss (2005). En dicha revisión, se reportó un incremento promedio del 16% en la actividad de la GSH-Px y un 20% en la concentración de Se en sangre. Esta situación puede estar relacionada con una mejoría en la función inmune, pues se ha establecido que animales con deficiencia del mineral están expuestos a un estrés oxidativo, especialmente durante el período cercano al parto donde suelen haber balances energéticos negativos y una reducción en la concentración sanguínea de algunos minerales (Goff 2006, Silvestre *et al.* 2007).

Cuadro 3. Efecto de la fuente de Se sobre distintos parámetros en el ganado lechero reportado en diferentes investigaciones.

Parámetro	Efecto del Se orgánico	
	vs. Se inorgánico	Referencia
Se en plasma de vacas	Incrementó	Pehrson <i>et al.</i> 1999
Se en sangre de vacas	Incrementó	Awadeh <i>et al.</i> 1998
Se en músculo de vacas	Incrementó	Ortman y Pehrson 1997
Actividad de GSH-Px en vacas	Incrementó	Malbe <i>et al.</i> 1995
Se en calostro	Incrementó	Harrison <i>et al.</i> 2005
Se en leche	Incrementó	Knowles <i>et al.</i> 1999
Se en sangre de terneros	Incrementó	Gunter <i>et al.</i> 2003
Conteo de células somáticas	Disminuyó	Elliot <i>et al.</i> 2005
Retención de placenta	Disminuyó	Elliot <i>et al.</i> 2005
Endometritis postparto	Disminuyó	Elliot <i>et al.</i> 2005
Servicios por concepción	Disminuyó	Elliot <i>et al.</i> 2005

Al respecto, Weiss y Hogan (2005) sugieren que el beneficio sobre la salud de la glándula mamaria se debe probablemente a una mejora en el funcionamiento de los neutrófilos. Cerri *et al.* (2009) destacan una mejoría en el desempeño reproductivo, evidenciado en la fertilidad y el desarrollo embrionario, relacionada con la remoción de los radicales libres a través de un incremento en la actividad de la GSH-Px.

En una investigación realizada en Suecia por Ortman y Pehrson (1997) donde se estudió la disponibilidad de las fuentes de Se en vacas lecheras durante 9 meses y su respectivo efecto sobre el contenido de Se en sangre, demostró que la suplementación con 0,75 mg de Se provenientes de selenolevadura mantuvo la

concentración de Se en sangre al mismo nivel que los 3 mg de Se provenientes del selenito de sodio. De la misma manera, las vacas que recibieron 3 mg de selenolevadura, presentaron un incremento de 40% respecto a los otros grupos.

En efecto, la selenolevadura es la única fuente de Se orgánico aprobada en los Estados Unidos desde el 2003 (Food and Drug Administration 2003) y en la Unión Europea desde el 2006 (Official Journal of the European Union 2006). Esta se define como una levadura seca y no viable (*Saccharomyces cerevisiae*), que se fermenta en un *fed-batch* que le provee cantidades crecientes de melaza de caña y sales de Se. Durante dicha fermentación, la levadura consume el Se y lo incorpora en varios compuestos orgánicos, resultando la SeMet como la forma más prevalente en el producto final (Weiss 2005).

Adicionalmente, revisiones de literatura realizadas por Weiss (2003) y Ceballos *et al.* (2009) reportaron que cuando las vacas son suplementadas con una fuente orgánica de Se como la selenolevadura, la transferencia del mineral a la leche es más efectiva en comparación con cantidades similares de Se en forma inorgánica.

En un estudio conducido por Calamari *et al.* (2010) para determinar el efecto de la fuente y dosis de Se durante 140 días, la concentración de Se en leche fue mayor en las vacas suplementadas con la selenolevadura respecto al selenito de sodio, encontrando que 16,3% del Se ofrecido fue transferido a la

leche mientras que en las vacas alimentadas con selenito de sodio la recuperación fue apenas 3,2%. Asimismo, la concentración de SeMet únicamente se incrementó en las vacas suplementadas con la selenolevadura, lo que implica una mayor eficiencia en la transferencia a la leche.

Precisamente, una de las razones por la que se excreta más Se en leche se debe a que la glándula mamaria extrae grandes cantidades de Met para sintetizar las proteínas de la leche. Por ello, se considera que del total de Se presente en la leche bovina un 60-80% está asociado con las caseínas, 20-40% con las proteínas del suero y 10-25% correspondería a una baja fracción molecular (Swensson y Lindmark-Månsson 2007).

En estudios recientes, se han suministrado altas cantidades de Se a vacas lecheras para evaluar tanto la tolerancia de los animales y su subsecuente efecto en la salud (Juniper *et al.* 2008) como para proveer leche con una concentración de Se específicamente alta para obtener productos lácteos enriquecidos con Se pensados como beneficiosos para la salud humana (Heard *et al.* 2007, Walker *et al.* 2010, Stockdale *et al.* 2011).

Clark *et al.* (1996) realizaron el descubrimiento más importante de asociar dosis supranutricionales de Se con la protección ante un posible cáncer. El nivel de Se en el cual se considera más probable la efectividad para prevenir la quimo prevención exceden las recomendaciones diarias permitidas de $50-70 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ con

un requerimiento mínimo de $40 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ (Institute of Medicine 2000). Sin embargo, se ha demostrado que consumos de $100\text{-}200 \mu\text{g Se}\cdot\text{d}^{-1}$ inhiben el desarrollo de cáncer en humanos con un límite máximo tolerable de $400 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ (El-Bahoumy 2001).

Ante esto, las cantidades de Se orgánico requeridas para producir leche y sus derivados enriquecidos pueden ser hasta 50 veces más altas que lo requerido para prevenir una deficiencia en el ganado lechero. En la actualidad, estos niveles de consumo de Se no son permitidos en ciertas regiones a causa de restricciones legales. Por ejemplo, en los Estados Unidos las regulaciones de la Food and Drug Administration limita la suplementación de Se a $0,3 \text{ mg}\cdot\text{kg de MS}^{-1}$, en la Unión Europea la dosis máxima permitida es $0,568 \text{ mg}\cdot\text{kg de MS}^{-1}$, mientras que en otras áreas existen niveles de consumo recomendados en lugar de requisitos legales (Juniper *et al.* 2006).

Considerables investigaciones se han realizado en ganado lechero, donde las vacas han sido alimentadas con dietas que contienen entre 2 y 134 mg de $\text{Se}\cdot\text{d}^{-1}$, resultando en concentraciones de Se en leche desde 7 hasta 551 mg de $\text{Se}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ceballos *et al.* 2009). Gran parte de esta investigación se ha ocupado en la producción de leche o productos lácteos para el consumo humano que ayude a aliviar las deficiencias de Se mientras que algunas de éstas se han destinado a proporcionar niveles supranutricionales de Se para la salud humana (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la fuente y dosis de suplementación de Se sobre el contenido de Se en leche reportado en diferentes investigaciones.

Referencia	País ¹	Etapa ²	Fuente ³	Dosis (mg·d ⁻¹)	Días	Se leche (µg·L ⁻¹)	P
Bis Wencel (2003)	PL	T	Na-Sel	0,6	79	105,8	*
Wiewiora <i>et al.</i> (2003)	PL	T	Na-Sel	2,1	83	5,5	*
Juniper <i>et al.</i> (2006)	GB	T	Na-Sel	2,3	35	20,5	*
Muniz-Naveiro <i>et al.</i> (2005)	ES	M	Na-Sel	2,9	35	23,7	*
Conrad y Moxon (1979)	US	M	Na-Sel	3,0	67	15,0	
Knowles <i>et al.</i> (1999)	NZ	M	Na-Sel	3,0	88	13,4	*
Ortman y Pehrson (1999)	SE	T	Na-Sel	3,0	63	16,6	*
Hemken <i>et al.</i> (1998)	US	T	Na-Sel	3,1	70	51,3	*
Phipps <i>et al.</i> (2008)	UK	M	Na-Sel	3,2	112	39,5	*
Gierus <i>et al.</i> (2002)	DE	T	Na-Sel	3,5	49	13,4	*
Malbe <i>et al.</i> (1995)	EE	M	Na-Sel	4,2	56	23,7	
Brzoska y Brzoska (2004)	PL	T	Na-Sel	4,8	84	18,2	*
Aspila (1991)	FI	M	Na-Sel	6,2	77	11,8	*
Hemken <i>et al.</i> (1998)	US	T	Na-Sel	6,3	70	60,0	*
Waldron <i>et al.</i> (2004)	US	M	Na-Sel	7,5	42	8,7	*

¹Código de país donde se realizó la investigación.

²Etapa de lactancia del estudio: T = < 100 días de lactancia; M = > 100 días de lactancia.

³Fuente de Se: Na-Sel = selenato o selenito de sodio; SeMet = selenometionina.

*P < 0,05.

Cuadro 4. Efecto de la fuente y dosis de suplementación de Se sobre el contenido de Se en leche reportado en diferentes investigaciones (*continuación*).

Referencia	País ¹	Etapas ²	Fuente ³	Dosis (mg·d ⁻¹)	Días	Se leche (µg·L ⁻¹)	P
Batchelor (2002)	AU	M	SeMet	2,4	45	64,8	*
Muniz-Naveiro <i>et al.</i> (2005)	ES	M	SeMet	2,8	35	30,8	*
Knowles <i>et al.</i> (1999)	NZ	M	SeMet	3,0	88	40,3	*
Ortman y Pehrson (1999)	SE	T	SeMet	3,0	63	31,6	*
McIntosh y Royle (2002)	AU	M	SeMet	4,0	42	20,5	*
Malbe <i>et al.</i> (1995)	EE	M	SeMet	4,2	56	64,0	
Juniper <i>et al.</i> (2006)	GB	T	SeMet	4,3	35	40,3	*
Phipps <i>et al.</i> (2008)	UK	M	SeMet	4,9	112	66,3	*
Charmley <i>et al.</i> (1993)	CA	T	SeMet	5,0	56	34,7	*
Paschoal <i>et al.</i> (2007)	BR	M	SeMet	5,0	56	31,6	*
Givens <i>et al.</i> (2004)	UK	M	SeMet	8,5	56	28,0	*
Heard <i>et al.</i> (2007)	AU	T	SeMet	10,9	32	99,5	*
Heard <i>et al.</i> (2007)	AU	M	SeMet	11,6	32	114,5	*

¹Código de país donde se realizó la investigación.

²Etapas de lactancia del estudio: T = < 100 días de lactancia; M = > 100 días de lactancia.

³Fuente de Se: Na-Sel = selenato o selenito de sodio; SeMet = selenometionina.

*P < 0,05.

Invariablemente, las concentraciones de Se en leche y sangre han sido positivamente relacionadas con el consumo de Se y en la actualidad es técnicamente factible producir leche con altas concentraciones de Se (Givens *et al.* 2004, Juniper *et al.* 2006, Doyle *et al.* 2011). Al respecto, Stockdale y Gill (2011) encontraron que por cada mg de Se consumido, la concentración de Se mostró un incremento de 4,5 y 3,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en leche y sangre, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y manejo.

El experimento fue conducido en la Hacienda Terranova (10°16'N, 84°19'O) entre Diciembre de 2011 y Mayo de 2012. El estudio involucró 40 vacas Holstein multíparas al momento del parto con un peso y condición corporal promedio de 607 ± 62 kg y $2,90 \pm 0,21$, respectivamente; las cuales fueron asignadas aleatoriamente a 2 tratamientos. En ambos casos, las vacas pastorearon Kikuyo (*Kikuyochloa clandestinum*) con una disponibilidad de $27 \text{ kg MS} \cdot \text{vaca}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$.

Las vacas fueron ordeñadas diariamente a las 0400 y 1500 h. Previo al ordeño, los animales consumieron una ración total mezclada (RTM) que consistió de 9 kg de silopaca de Kikuyo, 9 kg de cebada, 4 kg de alimento balanceado, 2 kg de melaza, 0,13 kg de grasa sobrepasante y 0,12 kg de una base mineral (Cuadro 5). Posteriormente, se ajustó el consumo de alimento balanceado conforme a la producción de leche en relación 3:1 (leche:concentrado).

De las 40 vacas que consumieron esta dieta basal, 20 fueron suplementadas diaria e individualmente con 3,0 mg de selenolevadura producida a partir de la *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060 (Sel-Plex, Alltech Biotechnology, Nicholasville, KY), la cual fue incorporada en 1,0 kg de alimento balanceado que fue suministrado previo al ordeño de la tarde a partir del día 5^{to} hasta el día 56 post-parto. La concentración de Se en la dieta basal varió entre

0,67 y 0,72 mg·kg MS⁻¹ mientras que durante el período de suplementación, la concentración de Se en la dieta de las vacas suplementadas osciló entre 0,80 y 0,91 mg·kg MS⁻¹.

Cuadro 5. Composición nutricional de los ingredientes que componen la dieta basal de las vacas en el estudio.¹

Ítem	RTM	Kikuyo	Alimento Se enriquecido
Materia seca (%)	39,0	12,7	87,7
Ingredientes (% MS)			
Alimento balanceado	37,1	-	-
Cebada	23,2	-	-
Silopaca de Kikuyo	21,5	-	-
Melaza	15,7	-	-
Grasa sobrepasante	1,24	-	-
Base mineral	1,24	-	-
Nutrientes (Base MS)			
PC (%)	20,0	23,4	18,7
FDN (%)	32,2	56,5	18,6
EN _i ² (Mcal·kg ⁻¹)	1,68	1,51	1,86
Se (mg·kg ⁻¹)	1,04	0,16	3,49

¹Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad, Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L. y Asesorías Químicas y Laboratorio Químico S.A. (AQYLASA).

²Estimada a partir de las ecuaciones del NRC (2001).

Procedimientos de muestreo y mediciones.

Estimación del consumo de materia seca y análisis en alimentos.

La disponibilidad del forraje se estimó mensualmente utilizando la metodología denominada Botanal® descrita por Hargraves y Kerr (1978), mientras que el CMS proveniente del forraje se estimó por el método de reversa (van der Grinten *et al.* 1992). La composición nutricional del forraje e ingredientes de la RTM fue determinada mensualmente tomando muestras representativas a las que se les analizó el contenido de MS y PC según la metodología propuesta por AOAC (2005), de FDN y FDA conforme a la metodología de Van Soest y Robertson (1985), de la fracción de nitrógeno ligado a la FDN y FDA de acuerdo a la metodología establecida por Licitra *et al.* (1996), de EE, cenizas y lignina utilizando Espectroscopía Infrarroja Cercana (InfraXact™, Foss Electric, York, UK) y la EN_i fue estimada empleando las ecuaciones del NRC (2001).

Producción y composición láctea.

En los días 5, 14, 28, 42 y 56 del período experimental, se midió individualmente la producción de leche y se tomaron muestras durante el ordeño de la mañana para determinar el contenido de grasa, proteína y lactosa (MilkoScan™ FT120, Foss Electric, Hillerød, DK), así como el CCS (Fossomatic™ 420 Series, Foss Electric, Hillerød, DK). Los datos de composición fueron combinados con la producción de leche correspondiente para calcular la

producción de los componentes y la leche corregida por energía (LCE) de acuerdo a la ecuación propuesta por Sjaunja *et al.* (1990):

$$\text{LCE (kg·día}^{-1}\text{)} = \text{Leche (kg·día}^{-1}\text{)} \times [38,3 \times \text{Grasa (g·kg}^{-1}\text{)} + 24,2 \times \text{Proteína (g·kg}^{-1}\text{)} + 16,54 \times \text{Lactosa (g·kg}^{-1}\text{)} + 20,7] / 3140$$

Análisis de selenio.

El contenido de Se en leche, forraje e ingredientes de la RTM fue determinado después de digerir 0,5 g de la muestra en una mezcla de 6 mL de ácido nítrico y 2 mL de peróxido de hidrógeno al 30% mediante tubos de ensayo equipados con embudos de reflujo en un bloque de digestión calentado eléctricamente para reducir el Se (V) a Se (III). Posterior al proceso de digestión, los extractos resultantes fueron diluidos con agua bidestilada (10 mL volumen final) y analizados por espectrofotometría de absorción atómica (ZEE nit 700P, Analytik Jena AG, Jena, DE). En todos los análisis se utilizó el material estándar de referencia SRM 1849a (Infant/Adult Nutritional Formula) certificado por el National Institute of Standards and Technology (NIST), con recuperaciones aceptables entre 81 y 107%.

Hematología y química sanguínea.

Durante el ordeño de la mañana de los días 5, 14, 28, 42 y 56 del período experimental, se obtuvieron muestras individuales de 4 mL de sangre heparinizada mediante venopunción coccígea empleando el sistema de tubos al vacío

(Vacuette® LH Lithium Heparin, Kremsmünster, AT) para establecer el contenido de hemoglobina (Hb) y la actividad en sangre de la enzima GSH-Px, como parámetros hematológicos y químicos, respectivamente, empleando un analizador químico clínico (Mindray BS-380, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, Shenzhen, CN). Concretamente, para determinar la actividad en sangre de la GSH-Px a 37 °C, se mezclaron 0,05 mL de sangre con 2 mL de agente diluyente utilizando un kit comercial (Ransel, Randox Laboratories Ltd., Antrim, UK) acorde a la metodología establecida por Paglia y Valentine (1967).

Evaluación reproductiva.

Los ovarios fueron examinados en los días 22 y 57 post-parto con ultrasonografía transrectal utilizando una sonda linear de 8,5 MHz (Ibex™ Pro, E.I. Medical Imaging, Loveland, CO) para determinar el diámetro folicular. Adicionalmente, se registró el intervalo parto-primer servicio, intervalo parto-concepción y servicios por concepción.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el procedimiento MIXED de SAS (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC), donde la vaca fue considerada como variable aleatoria y el modelo estadístico fue:

$$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Donde:

y_{ij} : variable de respuesta de la j -ésima unidad experimental en el i -ésimo tratamiento.

μ : media general.

T_i : efecto del i -ésimo tratamiento.

e_{ij} : error experimental.

El número de lactancia, la producción láctea previa y el CCS inicial, fueron consideradas como covariables. A su vez, el efecto del tratamiento para las variables evaluadas se consideró una tendencia cuando $0,05 < P \leq 0,10$ y significativo cuando $P \leq 0,05$, en este caso se realizó la comparación entre medias utilizando la prueba de Waller-Duncan.

OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto de la suplementación con selenio orgánico post-parto sobre el desempeño productivo y reproductivo de vacas lecheras en pastoreo.

Específicos

- Determinar el efecto de la suplementación con selenio orgánico sobre la producción y composición láctea.
- Determinar el efecto de la suplementación con selenio orgánico sobre el contenido de selenio en leche y su respectivo aporte a la recomendación dietética diaria para humanos.
- Determinar el efecto de la suplementación con selenio sobre la actividad de la enzima Glutación Peroxidasa.
- Determinar el efecto de la suplementación con selenio orgánico sobre el diámetro folicular y los siguientes parámetros de fertilidad: intervalo parto-primer servicio, intervalo parto-concepción, servicios por concepción y diámetro folicular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Consumo voluntario, producción y composición láctea.

La producción de leche y composición láctea (grasa, proteína, lactosa, CCS), así como el CMS no difirieron entre los tratamientos durante el período de suplementación (Cuadro 6 y 8). Estos resultados respaldan el hecho de que es poco probable que tanto la fuente como el contenido de Se en la dieta afecte la producción de leche o la concentración de sus componentes (Givens *et al.* 2004, Juniper *et al.* 2006, Heard *et al.* 2007, Walker *et al.* 2010, Stockdale *et al.* 2011).

No obstante, se han registrado respuestas en la producción de leche en estudios realizados en Australia y Nueva Zelanda, donde por lo general las pasturas suelen contener niveles marginales de Se ($< 0,03 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; Combs y Lu 2001). Así, Tasker *et al.* (1987) resaltan que podría esperarse una respuesta en la producción de leche en animales con concentraciones de Se en sangre inferiores a $9,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pues según Silvestre *et al.* (2007) un aumento en la actividad de la selenoproteína ID, la cual se encarga de regular procesos metabólicos, podría ocasionar incrementos de 2,0-2,5% en la producción de leche.

Por su parte, a pesar de que Weiss *et al.* (1990) establecieron una relación positiva entre el incremento en la concentración plasmática de Se en vacas lactantes y el CCS, el presente estudio no comprobó una reducción estadísticamente significativa del CCS, probablemente debido a que el CCS en el

Cuadro 6. Efecto de la suplementación post-parto con selenolevadura sobre la producción y composición láctea de vacas lecheras en pastoreo.

Ítem	Control					Experimental					EEM
	5	14	28	42	56	5	14	28	42	56	
Leche, kg	25,9	35,5	39,6	40,7	41,7	23,8	35,9	38,8	39,6	40,2	1,30
LCE ¹ , kg	26,8	29,1	30,5	31,2	29,9	24,5	30,4	30,3	30,1	31,8	1,65
Composición, %											
Grasa	4,28	3,67	3,30	3,16	3,04	4,09	3,46	3,24	2,97	3,06	0,20
Proteína	3,90	3,38	2,89	2,80	2,81	3,98	3,31	2,91	2,81	2,74	0,06
Lactosa	4,12	4,64	4,68	4,61	4,62	4,18	4,70	4,74	4,73	4,70	0,07
Componentes, kg·d ⁻¹											
Grasa	1,19	1,25	1,28	1,27	1,23	1,06	1,19	1,29	1,17	1,27	0,09
Proteína	1,01	1,20	1,17	1,14	1,18	1,01	1,19	1,14	1,13	1,14	0,04
Lactosa	1,07	1,65	1,87	1,89	1,94	0,97	1,67	1,83	1,87	1,88	0,07
CCS, log ²	5,30	4,10	2,75	2,75	2,97	4,88	2,98	2,37	2,42	1,76	0,74

¹LCE = Leche Corregida por Energía.

²Transformación logarítmica del CCS ($y = \text{Log}_2(\text{CCS}/100) + 3$) según Dabdoud y Shook (1984).

EEM = Error Estándar de la Media.

grupo Control fue relativamente bajo. A pesar de esta situación, el CCS en el grupo Experimental fue consistentemente menor durante el período experimental (110.000 vs. 65.000 células·mL⁻¹).

Weiss (2003) y Silvestre *et al.* (2007) sugieren que el beneficio de la suplementación con Se sobre la salud de la glándula mamaria se debe a los efectos sobre los neutrófilos y otras células inmunes. En este sentido, Velichko *et al.* (2006) reportaron una disminución del 14,5% en el CCS y una reducción del 54 y 89% en los casos de mastitis clínica y subclínica, respectivamente. En la presente investigación, no se presentaron casos de mastitis clínica en las vacas suplementadas con Se orgánico mientras que la incidencia en el grupo Control fue de 15%.

Contenido de selenio en leche.

La concentración promedio de Se en leche en las vacas previo a la suplementación (5 d) fue 10,6 µg·L⁻¹, dato afín a los valores reportados en la literatura para vacas lecheras (Cuadro 4). La suplementación con Se orgánico incrementó significativamente tanto la concentración como la excreción de Se en la leche durante el período experimental ($P < 0,01$; Figura 3).

De igual forma, la eficiencia aparente de la transferencia del Se a la leche expresada como la cantidad de Se secretado en la leche en proporción al Se consumido, fue afectada por la suplementación con Se orgánico ($P < 0,01$). En

este sentido, en las vacas del grupo Control la eficiencia promedio fue 7,9% (5,4-10,1%) en comparación con 9,9% (7,1-13,5%) registrado en las vacas del grupo Experimental.

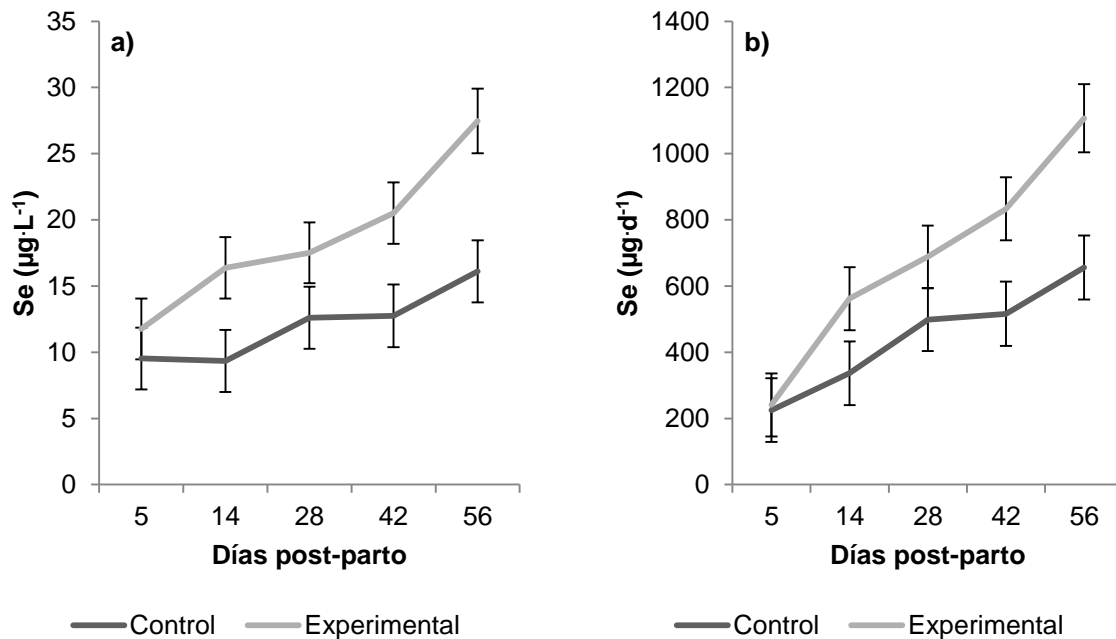


Figura 3. Efecto de la suplementación post-parto con selenolevadadura sobre a) la concentración y b) la excreción de Se en leche de vacas lecheras en pastoreo.

Sin embargo, esta proporción del Se consumido transferido a la leche, podría considerarse pequeña en comparación con el 17% reportado por Walker *et al.* (2010) pero similar a los valores reportados por Heard *et al.* (2007) en vacas en lactancia tardía (10-14%); no obstante, los autores encontraron que estas vacas secretan una mayor proporción de Se en leche durante la etapa inicial de su lactancia (20-28%).

La transferencia del Se dietético a la leche fue marcadamente más eficiente en las vacas suplementadas con Se orgánico (Figura 4), reafirmando que el Se proveniente de esta fuente es mejor absorbido que el Se derivado de formas inorgánicas, situación debida probablemente a la composición de aminoácidos de las proteínas de la leche (Weiss 2005).

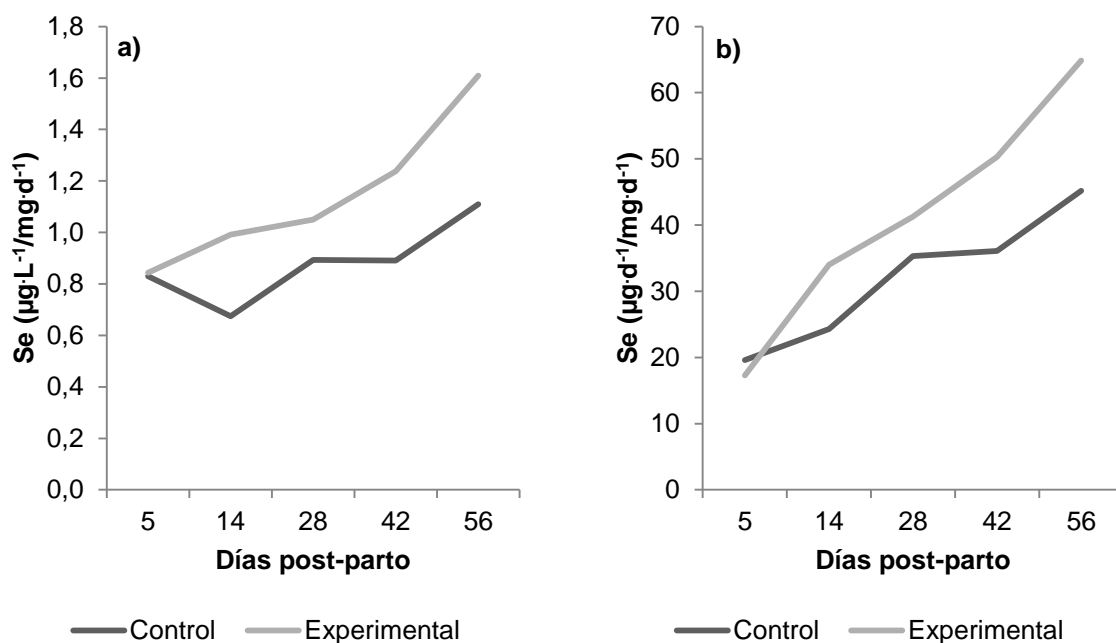


Figura 4. Efecto del incremento en el consumo total de Se post-parto sobre a) la concentración y b) la excreción de Se en leche de vacas lecheras en pastoreo.

El incremento relativo promedio en la concentración de Se en leche al suplementar con Se orgánico fue de 61% (20,5 vs. 12,7 µg·L⁻¹), el cual se encuentra por debajo del 90% reportado en una revisión de 10 estudios realizada por Weiss (2005). Sin embargo, se encuentra dentro del amplio rango existente en

la respuesta a la suplementación con Se orgánico (Figura 5), ya que se han reportado incrementos relativos en la concentración de Se en leche desde un 15% (Fisher *et al.* 1995) hasta 160% (Knowles *et al.* 1999).

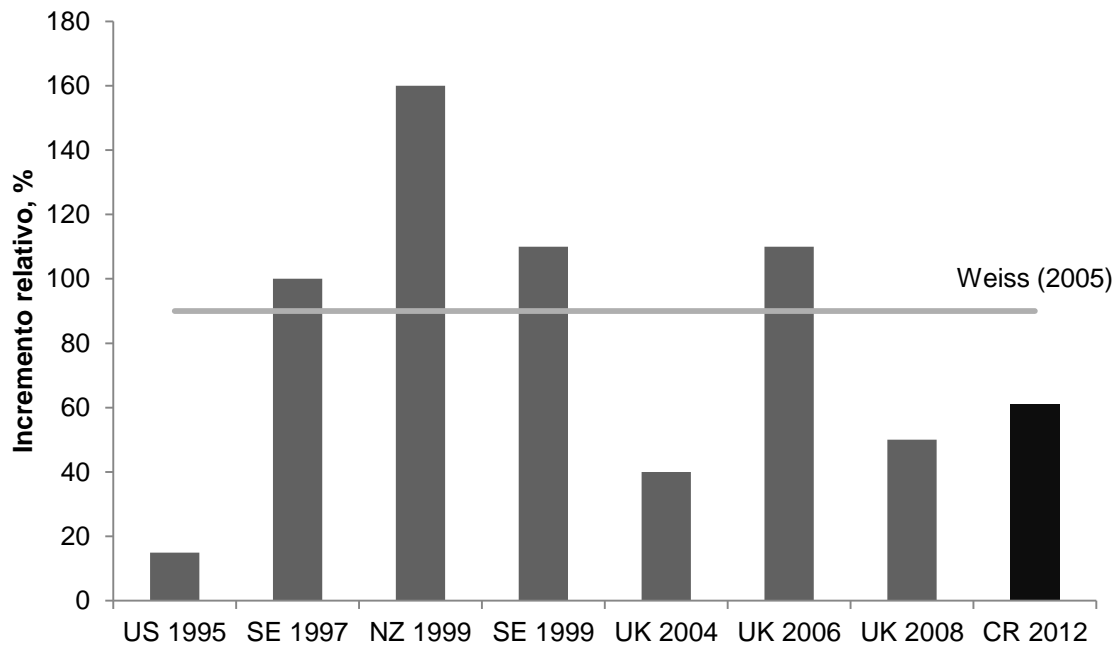


Figura 5. Incremento relativo en la concentración de Se en leche de vacas lecheras suplementadas con selenolevadura respecto a una fuente inorgánica reportado en diferentes investigaciones.

De acuerdo con Heard *et al.* (2007), muchas compañías de lácteos están aumentando su interés en el desarrollo de productos especializados, específicamente en relación con el Se y el desafío es desarrollar sistemas de alimentación en lecherías que produzcan leche con concentraciones de Se consistentes y predecibles para que los productos enriquecidos con Se puedan cumplir con las especificaciones predeterminadas.

Con respecto a lo anterior, Givens *et al.* (2004) establecieron mediante regresiones lineales la relación entre el Se dietético y la concentración de Se en leche. En el presente estudio, la dispersión de los datos mostrada en la Figura 6 indica una inadecuada relación entre la concentración de Se en la dieta y la concentración de Se en la leche por lo que no podría considerarse tan buen predictor de la concentración de Se en leche como lo es el consumo de Se (Figura 7), de manera que las regresiones lineales que establecen la relación entre el consumo de Se y la concentración de Se en leche fueron:

Control: Concentración de Se en leche ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

$$= 9,44 \times \text{consumo Se total (mg}\cdot\text{d}^{-1}) - 121,34; R^2 = 0,92$$

Experimental: Concentración de Se en leche ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

$$= 18,19 \times \text{consumo Se total (mg}\cdot\text{d}^{-1}) - 283,46; R^2 = 0,82$$

La respuesta en la concentración de Se en leche fue de $8,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ por cada mg de Se orgánico consumido lo que se asemeja a lo encontrado por Heard *et al.* (2007) y Walker *et al.* (2010) quienes conjuntamente reportaron una respuesta de $7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ por cada mg de Se consumido mientras que Stockdale *et al.* (2011) reportaron $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

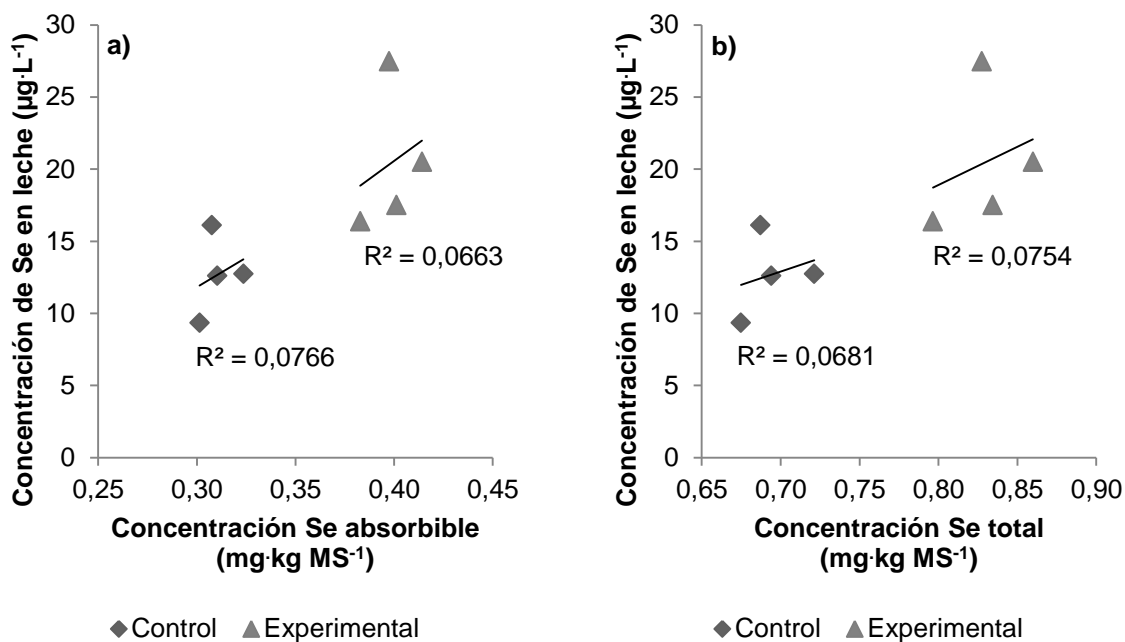


Figura 6. Relación entre la concentración de a) Se absorbible y b) Se total y la concentración de Se en leche de vacas lecheras en pastoreo.

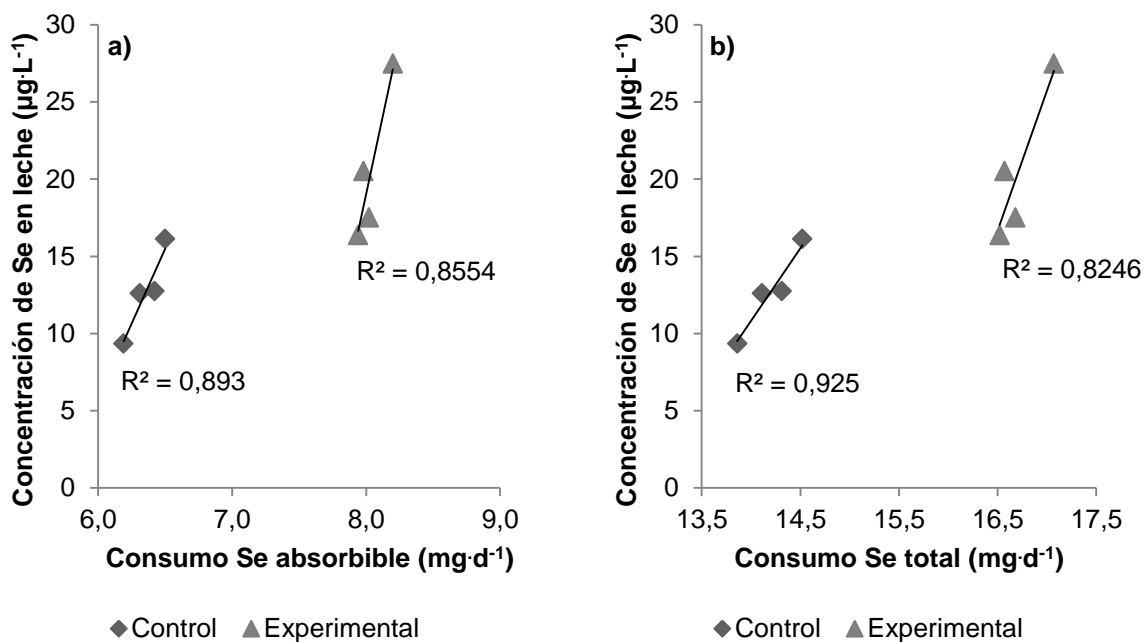


Figura 7. Relación entre el consumo de a) Se absorbible y b) Se total y la concentración de Se en leche de vacas lecheras en pastoreo.

El incremento en la concentración de Se en leche encontrado en este experimento muestra que suplementar vacas lecheras con Se orgánico podría ser una vía útil para incrementar el consumo de Se en humanos. Actualmente, en Costa Rica no existen lineamientos que sugieran cual debería ser la concentración de Se en leche; sin embargo, Aspila (1991) propuso que una concentración deseable debería ser alrededor de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

En el presente estudio, dicha concentración no fue alcanzada en el grupo Control ($9,3\text{-}16,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) mientras que en el grupo Experimental la concentración osciló entre $16,4$ y $27,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante el período de suplementación. Aspila (1991) concluye que cuando se utiliza una fuente de Se inorgánica como selenito de sodio, las vacas deberían ser alimentadas con dietas que contengan alrededor de $0,7 \text{ mg}\cdot\text{kg MS}^{-1}$, lo cual supera las máximas concentraciones permitidas, a pesar de que se asemejan a las concentraciones determinadas en el grupo Control.

La recomendación dietética diaria de Se para humanos depende del sexo y la edad, pero el requerimiento diario para adultos ronda los $55 \mu\text{g}$ (Institute of Medicine 2000). Actualmente en Costa Rica, la concentración de Se en leche ronda los $5,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3,2\text{-}8,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; valores obtenidos mediante monitoreo en fincas lecheras ubicadas en la zona de Alajuela, Ciudad Quesada y Guanacaste, datos sin publicar; Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentración de Se en muestras de leche de diferentes localidades de Costa Rica.

Procedencia	Concentración de Se	
	$\mu\text{g}\cdot\text{kg MS}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Alajuela	0,06	8,04
Ciudad Quesada	0,02	3,18
Guanacaste	0,04	4,89
Promedio	0,04	5,37

Por lo que si se considera un consumo diario de 250 mL de leche, el aporte de Se proveniente de la leche a la recomendación diaria actual sería de 2,6%. Acorde con estos resultados, para proveer al menos un 10% de la recomendación dietética diaria de Se en 250 mL de leche ($22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), las vacas deberían consumir diariamente al menos 2,2 mg de selenolevadura para ser un alimento fuente de Se, según el Institute of Medicine (2000).

Actividad de la enzima Glutación peroxidasa.

La actividad de la enzima GSH-Px y la concentración de Se en sangre promedio en las vacas previo a la suplementación (5 d) fue $219,7 \text{ U}\cdot\text{g Hb}^{-1}$ y $183,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. La suplementación con selenio orgánico no alteró significativamente el contenido de Hb, la actividad de la GSH-Px ni la concentración de Se en sangre durante el período experimental (Cuadro 9), resultados similares a los reportados por Knowles *et al.* (1999) en Nueva Zelanda y Juniper *et al.* (2006) en el Reino Unido.

A pesar de esta situación, al suplementar con Se orgánico la actividad de la GSH-Px fue numéricamente mayor respecto al grupo Control, generando un incremento relativo promedio de 11% (220,3 vs. 199,0 U·g Hb⁻¹), ligeramente menor al 16% reportado en la revisión realizada por Weiss (2005). La principal respuesta en dichos estudios fue particularmente notoria cuando el consumo total de Se en el grupo Control fue relativamente bajo.

Tal es el caso de Knowles *et al.* (1999) quienes encontraron respuesta en la GSH-Px cuando el consumo total de Se fue 2,0 mg·d⁻¹ mas no cuando consumieron 4,0 mg·d⁻¹. Asimismo, esta menor respuesta con respecto a la leche puede deberse a que ésta tiene una concentración de Met aproximadamente 2 veces mayor que la proteína de la sangre, por lo que es 2 veces más probable que la SeMet sea incorporada en las proteínas de la leche en lugar de las sanguíneas.

En una investigación de 12 semanas realizada en Suecia por Ortman y Pehrson (1999) comparando los efectos de la fuente de Se, la actividad de la GSH-Px en vacas que consumieron selenato, selenito o SeMet, se mantuvo relativamente constante durante las primeras 6 semanas del estudio, pero luego se incrementó marcadamente hasta la semana 12.

Estos resultados son evidencia de una fase de latencia en la actividad de la GSH-Px, la cual se incrementa rápidamente posterior a la incorporación del Se en la GSH-Px durante su nueva síntesis en la eritropoyesis (Knowles *et al.* 1999). Es

Cuadro 8. Estimación del CMS, concentración y consumo de Se durante el período experimental.

Ítem	Control					Experimental				
	5	14	28	42	56	5	14	28	42	56
CMS total, kg·vaca ⁻¹	16,4	20,5	20,3	19,8	21,1	15,3	20,7	20,0	19,3	20,6
Consumo de Se, mg·vaca ⁻¹										
Absorbible	5,1	6,2	6,3	6,4	6,5	6,8	7,9	8,0	8,0	8,2
Total	11,5	13,9	14,1	14,3	14,5	13,9	16,5	16,7	16,6	17,1
Concentración de Se, mg·kg MS ⁻¹										
Absorbible ¹	0,31	0,30	0,31	0,32	0,31	0,44	0,38	0,40	0,41	0,40
Total	0,70	0,67	0,69	0,72	0,69	0,91	0,80	0,83	0,86	0,83

¹Se consideró una absorción de 45% para el Se inorgánico y 66% para la selenolevadura según Weiss (2005).

Cuadro 9. Efecto de la suplementación post-parto con selenolevadura sobre el contenido de Hb, la actividad de la GSH-Px y la concentración de Se en sangre de vacas lecheras en pastoreo.

Ítem	Control					Experimental				
	5	14	28	42	56	5	14	28	42	56
Hb, g·dL ⁻¹	9,9	8,7	8,5	8,4	8,6	9,7	8,6	8,5	8,4	8,7
GSH-Px, U·g Hb ⁻¹	203	180	240	185	189	246	227	239	197	212
Se sangre, µg·L ⁻¹	169	151	201	154	158	205	190	200	165	177

probable en este estudio que el período experimental de 7 semanas pudo haber limitado cambios en los eritrocitos y por ende las concentraciones de GSH-Px y de Se en sangre total, por lo que posibles resultados podrían verse después de 120-130 días de suplementación.

Debido a que en las vacas la concentración de Se en sangre es altamente correlacionada con la actividad de la GSH-Px (Erskine *et al.* 1987), el incremento relativo también fue de 11% (184,2 vs. 166,4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), igualmente por debajo del 20% reportado por Weiss (2005), pero dentro del rango reportado en diferentes investigaciones (Figura 8).

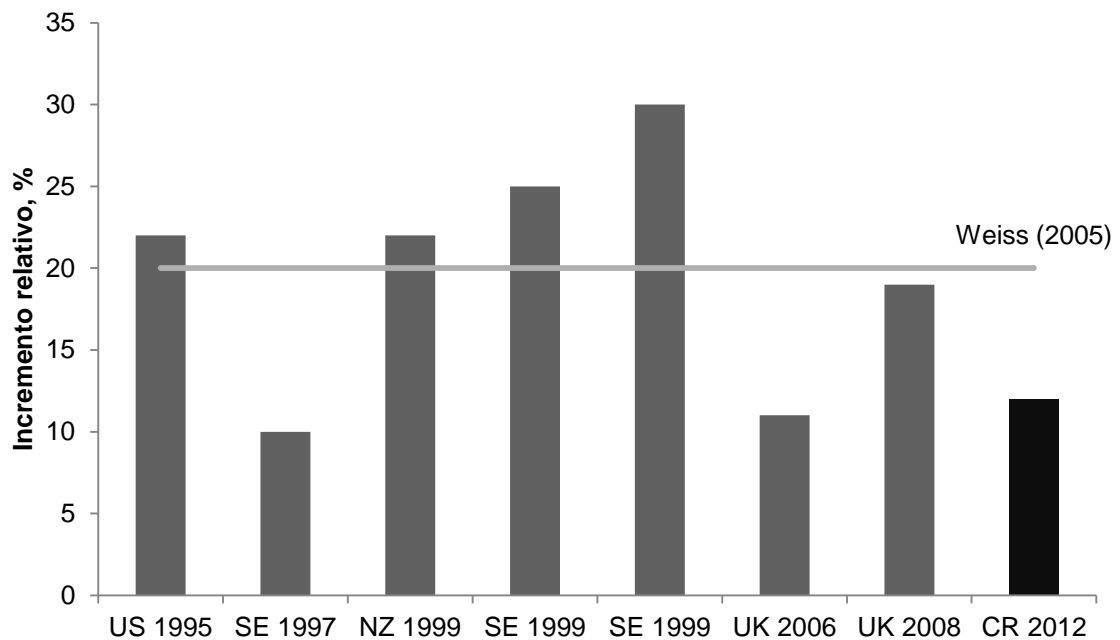


Figura 8. Incremento relativo en la concentración de Se en sangre de vacas lecheras suplementadas con selenolevadura respecto a una fuente inorgánica reportado en diferentes investigaciones.

Se ha considerado que para alcanzar una óptima capacidad inmune y fertilidad, un nivel adecuado de GSH-Px debe ser de $130 \text{ U}\cdot\text{g Hb}^{-1}$ (Ceballos y Wittwer 1996). La proporción de vacas con un nivel de marginal de GSH-Px fue menor en el grupo Experimental respecto al Control (7,7 vs. 12,2%), ligeramente superior al 5,3% reportado por Ceballos *et al.* (2003) en Colombia. Sin embargo, si se considera la concentración de Se en sangre como indicador, dicha proporción es mucho mayor puesto que el 61,5 y 63,4% de las vacas en el grupo Experimental y Control no alcanzaron los $180 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ recomendados por Weiss (2011).

Parámetros de fertilidad.

En el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) para las variables reproductivas estudiadas (Cuadro 9). Sin embargo, investigaciones previas han demostrado que tanto la deficiencia de Se como la presencia en exceso de especies reactivas de oxígeno afectan negativamente la capacitación espermática, la reacción del acrosoma, la formación del blastocito e incrementa la apoptosis en embriones jóvenes (Fujitani *et al.* 1997, Hsu *et al.* 1999, Uhm *et al.* 2007), por lo que es de esperar que si la suplementación con Se orgánico podría mejorar la acción de la GSH-Px, ésta a su vez podría mejorar los mecanismos celulares del embrión para deshacerse de los radicales libres y mejorar el funcionamiento de los neutrófilos (Cebra *et al.* 2003).

Estos efectos sobre el estrés oxidativo sugieren un impacto potencialmente positivo de un sistema antioxidante más eficiente sobre la fertilidad y el desarrollo embrionario temprano (Cerri *et al.* 2009). Sin embargo, la incapacidad de la suplementación con Se orgánico mostrada en el presente estudio para alterar la actividad de la GSH-Px y la concentración de Se en sangre podría haber impedido algún efecto sobre parámetros de fertilidad (Cuadro 10), coincidiendo con lo encontrado por Rutigliano *et al.* (2008) quienes reportaron que la fuente de Se no mejoró la actividad ovárica, la tasa de preñez ni la supervivencia embrionaria.

Cuadro 10. Efecto de la suplementación post-parto con Se sobre parámetros de fertilidad de vacas lecheras en pastoreo.

Ítem	Control	Experimental
Intervalo parto primer servicio, días	99	85
Intervalo parto concepción, días	111	100
Servicios por concepción, n	1,29	1,27
Primer servicio después de 90 d, %	50,0	36,4
Diámetro folicular 22 d, mm	12,8	13,0
Diámetro folicular 57 d, mm	13,1	16,0
Pérdidas económicas, \$·vaca ⁻¹	56,0	48,1

No obstante, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas el diámetro folicular de las vacas suplementadas con Se orgánico fue numéricamente mayor que el de las vacas correspondientes al grupo Control, principalmente al día 57 post-parto. En este sentido, un estudio realizado recientemente por Mossa *et al.* (2012) demostró que las vacas con un mayor

tamaño folicular tenían 3,3 veces más posibilidades de preñarse al primer servicio en comparación con vacas que tenían folículos pequeños. Esta podría ser la razón por la cual en el presente estudio se encontró una diferencia de 14 días en el intervalo parto primer servicio y de 11 días en el intervalo parto concepción, lo que podría implicar una retribución económica de \$8 por vaca.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La suplementación con selenolevadura no afectó significativamente el CMS, la producción y composición láctea. Sin embargo, mejoró el nivel de Se en las vacas, indicando una mayor biodisponibilidad del Se proveniente de esta fuente.

La concentración de Se en leche en las vacas suplementadas con selenolevadura fue significativamente mayor que en las vacas del grupo Control (61%).

La actividad sanguínea de la GSH-Px en las vacas suplementadas con selenolevadura fue numéricamente mayor que en las vacas del grupo Control (11%).

Incrementos en el nivel de inclusión de selenolevadura mostraron un efecto lineal positivo, representando alrededor de $9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ más por cada mg de Se consumido respecto al grupo Control.

La suplementación diaria con 3 mg de selenolevadura permitiría alcanzar concentraciones de Se que admitan a la leche como un alimento fuente de este mineral y contribuir a reducir su deficiencia en la población costarricense.

La suplementación con selenolevadura no afectó significativamente los parámetros de fertilidad evaluados en este estudio. Sin embargo, un mayor tamaño del diámetro folicular determinado al día 57 post-parto podría haber

favorecido la ovulación y por ende una reducción en el intervalo parto primer servicio y el intervalo parto concepción, lo cual podría implicar una retribución de \$8 por vaca.

Subsecuentes investigaciones son requeridas para determinar la excreción de Se en leche en otras etapas de la lactancia y el efecto de la suplementación durante el período seco sobre problemas reproductivos como retención de placenta y endometritis, así como el efecto de la duración de la suplementación sobre la actividad de la GSH-Px.

Al mismo tiempo, es preciso determinar la correlación entre la actividad de la GSH-Px y la concentración de Se en sangre, al igual que el efecto de la presencia de interacciones antagónicas con minerales como el azufre y el hierro, además de la capacidad antioxidante del Se en la leche y su efecto sobre la vida útil del producto terminado.

LITERATURA CITADA

- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS). 2005. Official methods of analysis of AOAC. 18th Ed. AOAC. Arlington, VA.
- ASPILA, P. 1991. Metabolism of selenite, selenomethionine and feed-incorporated selenium in lactating goats and dairy cows. *J. Agric. Sci. Finl.* 63: 1-74.
- AWADEH, F. T., ABDELRAHMAN, M. M., KINCAID, R. L., FINLEY, J. W. 1998. Effect of selenium supplements on the distribution of selenium among serum proteins in cattle. *J. Dairy Sci.* 81: 1089-1094.
- BATCHELOR, J. 2002. Supplementing selenium to pasture-based dairy cows. *Sel-Plex 136*. Alltech Inc., Nicholasville, KY.
- BIS WENCEL, H. 2003. Mineral elements level in milk of the cows with mineral dietary supplementation. *Ann. U. Mariae Curie-Sklodowska Sec. EE* 21: 259-264.
- BRZOSKA, F., BRZOSKA, B. 2004. Effect of dietary selenium on milk yield of cows and chemical composition of milk and blood. *Ann. Anim. Sci.* 4: 57-67.
- BURK, R. F. 1991. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J.* 5: 2274-2279.
- BURK, R. F., HILL, K. E., MOTLEY, A. K. 2001. Plasma selenium in specific and non-specific forms. *Biofactors* 14: 107-114.
- CALAMARI, L., PETRERA, F., BERTIN, G. 2010. Effects of either sodium selenite or Se yeast (Sc CNCM I-3060) supplementation on selenium status and milk characteristics in dairy cows. *Livestock Science* 128: 154-165.

- CEBALLOS, A., CORREA, H., LOAIZA, J., VILLA, N. A. 2003. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa como indicador del balance metabólico nutricional de selenio en rebaños lecheros de Manizales, Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 16 (1): 19-25.
- CEBALLOS, A., SÁNCHEZ, J., STRYHN, H., MONTGOMERY, J. B., BARKEMA, H. W., WICHTEL, J. J. 2009. Meta-analysis of the effect of oral selenium supplementation on milk selenium concentration in cattle. *J. Dairy Sci.* 92: 324-342.
- CEBALLOS, A., WITTEWER, F. G. 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria* 28 (2): 5-18.
- CEBRA, C. K., HEIDEL, J. R., CRISMAN, R. O., STANG, B. V. 2003. The relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and neutrophil function in postparturient Holstein cows. *J. Vet. Intern. Med.* 17: 902-907.
- CERRI, R. L. A., RUTIGLIANO, H. M., LIMA, F. S., ARAÚJO, D. B., SANTOS, J. E. P. 2009. Effect of source of supplemental selenium on uterine health and embryo quality in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 71: 1127-1137.
- CHARMLEY, E., NICHOLSON, J. W. G., ZEE, J. A. 1993. Effect of supplemental vitamin E and selenium in the diet on vitamin E and selenium levels and control of oxidized flavor in milk from Holstein cows. *Can. J. Anim. Sci.* 73: 453-457.
- CIGA (COMISIÓN INTERSECTORIAL DE GUÍAS ALIMENTARIAS). 2007. Actualización de lineamientos técnicos para la elaboración de las guías alimentarias de la población costarricense. 57 p.

- CLARK, L. C., COMBS, G. R., TURNBULL, B. W., SLATE, E. H., CHALKER, D. K., CHOW, J., DAVIS, L. S., GLOVER, R. A., GRAHAM, G. F., GROSS, E. G., KRONGRAD, A., LESHER, J. L., PARK, K. H., SANDERS, B. B., SMITH, C. L., TAYLOR, R. J. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *Journal of the American Medical Association* 276: 1957-1963.
- COMBS, G. F., LU, L. 2001. Selenium as a cancer preventative agent. *In: Selenium: Its molecular biology and role in human health* (Hatfield, D. L., ed.). Kluwer Academic Publishers. Norwell, MA. Pp: 205-217.
- CONRAD, H. R., MOXON, A. L. 1979. Transfer of dietary selenium to milk. *J. Dairy Sci.* 62: 401-411.
- DABDOUD, S. M., SHOOK, G. E. 1984. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count and clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 67: 163-164.
- DANIELS, L. A. 1996. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol. Trace Elem. Res.* 54: 185-199.
- DOYLE, P. T., STOCKDALE, C. R., JENKIN, M. L., WALKER, G. P., DUNSHEA, F. R., SHIELDS, P. M., MCKENNA, A. 2011. Producing milk with uniform high selenium concentrations on commercial dairy farms. *Anim. Prod. Sci.* 51: 87-94.
- DRACKLEY, J. K., DONKIN, S. S., REYNOLDS, C. K. 2006. Major advances in fundamental dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.* 89: 1324-1336.
- EASTRIDGE, M. L. 2006. Major advances in applied dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.* 89: 1311-1323.
- EDENS, F. W. 1996. Organic selenium: From feathers to muscle integrity to drip loss. Five years onward: No more selenite! *In: Biotechnology in the Feed*

Industry, Proceedings of Alltech's 12th Annual Symposium (K. A. Jacques y T. P. Lyons, eds). Nottingham University Press. Nottingham, UK. Pp: 349-376.

EL-BAHOUMY, K. 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. Mutation Research 475: 123-139.

ELLIOT, S., HARRISON, G., DAWSON, K. 2005. Selenium supplementation of dairy cattle: responses to organic and inorganic forms of selenium. Proceedings Midwestern section ASAS and Midwest Branch ADSA Meeting. Des Moines. Abstract 265.

ERSKINE, R. J., EBERHART, R. J., HUTCHINSON, J., SCHOLZ, R. W. 1987. Blood selenium concentration and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. JAVMA 11: 1417-1421.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). 2003. Food additives permitted in feed and drinking water of animals; Selenium yeast. Federal Register 68 (170): 52339-52340.

FISHER, D. D., SAXTON, S. W., ELLIOT, R. D., BEATTY, J. M. 1995. Effects of selenium source. Se status of lactating cows. Veterinary Clinical Nutrition 2 (2): 68-74.

FLOHÉ, L., GUNZLER, W. A., SCHOCK. 1973. Glutathione peroxidase. A selenoenzyme. FEBS Lett. 32:132-134.

FRANCESCONI, K. A., PANNIER, F. 2004. Selenium metabolites in urine: a critical overview of past work and current status. Clin. Chem. 50: 2240-2253.

FUJITANI, Y., KASAI, K., OHTANI, S., NISHIMURA, K., YAMADA, M., UTSUMI, K. 1997. Effect of oxygen concentration and free radical on *in vitro*

- development of *in vitro*-produced bovine embryos. J. Anim. Sci. 75: 483-489.
- GIERUS, M., SCHWARZ, F. J., KIRCHGESSNER, M. 2002. Selenium supplementation and selenium status of dairy cows fed diets based on grass, grass silage or maize silage. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) 86: 74-82.
- GIVENS, D. I., ALLISON, R., COTTRILL, B., BLAKE, J. S. 2004. Enhancing the selenium content of bovine milk through alteration of the form and concentration of selenium in the diet of the dairy cow. J. Sci. Food. Agric. 84: 811-817.
- GOFF, J. P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. J. Dairy Sci. 89: 1292-1301.
- GUNTER, S. A., BECK, P. A., PHILLIPS, J. M. 2003. Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves. J. Anim. Sci. 81: 856-864.
- HARGRAVES, J. N. G., KERR, J. D. 1978. Botanal: a comprehensive sampling and computing procedure for estimating pasture yield and composition. II. Computational package. Division of Tropical Crops and Pastures, Tropical Agronomy. CSIRO, Australia. Technical Memorandum No. 9.
- HARRISON, G. A., TRICARICO, J. M., LAWRENCE, B. 2005. Effect of Sel-Plex™ supplementation during the dry period on whole blood and colostrum selenium in dairy cows in a commercial dairy herd in the Southeastern US. Proceedings of the 21th Annual Symposium on Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Lexington, Kentucky (Suppl. 1). Abstract

- HATFIELD, D. L., GLADYSHEV, V. N. 2003. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell. Biol.* 22: 3565-3576.
- HEARD, J. W., STOCKDALE, C. R., WALKER, G. P., LEDDIN, C. M., DUNSHEA, F. R., MCINTOSH, G. H., SHIELDS, P. M., MCKENNA, A., YOUNG, G. P., DOYLE, P. T. 2007. Increasing selenium concentration in milk: Effects of amount of selenium from yeast and cereal grain supplements. *J. Dairy Sci.* 90: 4117-4127.
- HEMKEN, R. W., HARMON, R. J., TRAMMELL, S. 1998. Selenium for dairy cattle: A role for organic selenium. *Feed Compounder* 18: 22-24.
- HIMENO, S., IMURA, N. 2000. New aspects of physiological and pharmacological roles of selenium. *Journal of Health Science* 46 (6): 393-398.
- HSU, P., HSU, C., GUO, Y. L. 1999. Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida. *Toxicology* 139: 93-101.
- INSTITUTE OF MEDICINE. 2000. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. National Academy Press. Washington, DC. 529 p.
- IP, C., HAYES, C. 1989. Tissue selenium levels in selenium-supplemented rats and their relevance in mammary cancer protection. *Carcinogenesis* 10: 921-925.
- JUNIPER, D. T., PHIPPS, R. H., GIVENS, D. I., JONES, A. K., GREEN, C., BERTIN, G. 2008. Tolerance of ruminant animals to high dose in-feed administration of a selenium-enriched yeast. *J. Anim. Sci.* 86: 197-204.

- JUNIPER, D. T., PHIPPS, R. H., JONES, A. K., BERTIN, G. 2006. Selenium supplementation of lactating dairy cows: Effects of selenium concentration in blood, milk, urine, and feces. *J. Dairy Sci.* 89: 3544-3551.
- KNOWLES, S. O., GRACE, N. D., WURMS, K., LEE, J. 1999. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentrations in grazing cows. *J. Dairy Sci.* 82: 429-437.
- KRYUKOV, G. V., CASTELLANO, S., NOVOSELOV, S. V., LOBANOV, A. V., ZEHTAB, O., GULGÓ, R., GLADYSHEV, V. N. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439-1443.
- LEÓN, C., DE MAROTO, S. BLANCO, R., VALENTA, P. 1994. Análisis voltamperométrico de despojo catódico de selenio en muestras de algunos suelos de Costa Rica. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10 (1): 23-36.
- LICITRA, G., HERNANDEZ, T. M., VAN SOEST, P. J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57 (4): 347-358.
- LOW, S. C., HARNEY, J. W., BERRY, M. J. 1995. Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 270: 21659-21664.
- LYONS, M. P., PAPAZYAN, T. T., SURAI, P. F. 2007. Selenium in food chain and animal nutrition: Lessons from nature. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20 (7): 1135-1155.
- MALBE, M., KLAASSEN, M., FANG, W., MYLLYS, V., VIKERPUUR, M., NYHOLM, K., SANKARI, S., SUORANTA, K., SANDHOLM, M. 1995. Comparisons of selenite and selenium yeast feed supplements on Se-

- incorporation, mastitis, and leukocyte function in Se-deficient dairy cows. *J. Vet. Med. A* 42: 111-121.
- MAUS, R. W., MARTZ, F. A., BELYEA, R. L., WEISS, M. F. 1980. Relationship of dietary selenium to selenium in plasma and milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 63: 532-537.
- MCINTOSH, G. H., ROYLE, P. J. 2002. Supplementation of cows with organic selenium and the identification of selenium-rich protein fractions in milk. *In: Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 12th Annual Symposium* (K. A. Jacques y T. P. Lyons, eds). Nottingham University Press. Nottingham, UK. Pp: 233-238.
- MINISTERIO DE SALUD. 2010. Encuesta nacional de nutrición 2008-2009. Micronutrientes. 2 p.
- MOSSA, F., WALSH, S. W., BUTLER, S. T., BERRY, D. P., CARTER, F., LONERGAN, P., SMITH, G. W., IRELAND, J. J., EVANS, A. C. O. 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95: 2355-2361.
- MUNIZ-NAVEIRO, O., DOMINGUEZ-GONZALEZ, R., BERMEJO-BARRERA, A., COCHO DE JUAN, J. A., FRAGA-BERMUDEZ, J. M., GORIS-PEREIRAS, A., LOPEZ-SANTAMARINA, A., MARTINEZ-LEDE, I., VALLEDOR-PUENTE, J., FERNANDEZ-COUTO-GOMEZ, L., BERMEJO-BARRERA, P. 2005. Selenium content and distribution in cow's milk supplemented with two dietary selenium sources. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9817-9822.
- NAKAMURA, H., NAKAMURA, K., YODOI, J. 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 351-369.

- NOCEK, J. E., SOCHA, M. T., TOMLINSON, D. J. 2006. The effect of trace mineral fortification level and source on performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 2679-2693.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). 1983. Selenium in nutrition. Revised edition. National Academy Press. Washington, DC.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th revised edition. National Academy Press. Washington, DC.
- OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION. 2006. Commission regulation (EC) No. 1750/2006 concerning the authorization of selenomethionine as a feed additive. L 330/9-11.
- OKUNO, T., UENO, H., NAKAMURO, K. 2001. Contribution of enzymic α , γ -elimination reaction in detoxification pathway of selenomethionine in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176: 18-23.
- ORTMAN, K., PEHRSON, B. 1997. Selenite and selenium yeast as feed supplements for dairy cows. *J. Vet. Med. A* 44: 373-380.
- ORTMAN, K., PEHRSON, B. 1999. Effect of selenite as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. *J. Anim. Sci.* 77: 3365-3370.
- PAGLIA, D. E., VALENTINE, W. N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- PASCHOAL, J. J., ZANETTI, M. A., DEL CLARO, G. R., DE MELO, M. P., PUGINE, S. P., CUNHA, J. A. 2007. Fatty acid profile and oxidative stability of milk from Holstein cows fed with extruded soybean and organic selenium. *Pesquisa Agropecu. Bras.* 42: 1793-1799.

- PEHRSON, B. 1993. Diseases and diffuse disorders related to selenium deficiencies in ruminants. *Norw. J. Agric. Sci. (Suppl. 11)*: 79-93.
- PEHRSON, B., ORTMAN, K., MADJID, N., TRAFIKOWSKA, U. 1999. The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves. *J. Anim. Sci.* 77: 3371-3376.
- PHIPPS, R. H., GRANDISON, A. S., JONES, A. K., JUNIPER, D. T., RAMOS-MORALES, E., BERTIN, G. 2008. Selenium supplementation of lactating dairy cows: effects on milk production and total selenium content and speciation in blood, milk and cheese. *Animal* 2 (11): 1610-1618.
- RABIEE, A. R., LEAN, I. J., STEVENSON, M. A., SOCHA, M. T. 2010. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 93: 4239-4251.
- RAYMAN, M. P. 2012. Selenium and human health. *Lancet* 379: 1256-1268.
- RAYMAN, M. P., GOENAGA INFANTE, H., SARGENT, M. 2008. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition* 100: 238-253.
- REILLY, C. 2006. Selenium in food and health. 2nd edition. Springer, New York. 206 p.
- ROTRUCK, J. T., POPE, A. L., GANTHER, H. E., SWANSON, A. B., HAFEMAN, D. G., HOEKSTRA, W. G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- RUTIGLIANO, H. M., LIMA, F. S., CERRI, R. L. A., GRECO, L. F., VILELA, J. M., MAGALHÃES, V., SILVESTRE, F. T., THATCHER, W. W., SANTOS, J. E.

- P. 2008. Effects of method of presynchronization and source of selenium on uterine health and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 3323-3336.
- SCHWARZ, K., FOLTZ, C. M. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3292-3293.
- SILVESTRE, F. T., RUTIGLIANO, H. M., THATCHER, W. W., SANTOS, J. E. P., STAPLES, C. R. 2007. Effect of selenium source on production, reproduction, and immunity of lactating dairy cows. Florida Ruminant Nutrition Symposium. Gainesville, FL.
- SJAUNJA, L. O., BAEVRE, L., JUNKKARINEN, L., PEDERSEN, J., SETÄLÄ, J. 1990. A Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. 27th Session of the International Committee for Recording the Productivity of Milk Animals. Paris, France. 4 p.
- STOCKDALE, C. R., GILL, H. S. 2011. Effect of duration and level of supplementation of diets of lactating dairy cows with selenized yeast on selenium concentrations in milk and blood after the withdrawal of supplementation. *J. Dairy. Sci.* 94: 2351-2359.
- STOCKDALE, C. R., SHIELDS, P. M., MCKENNA, A., WALKER, G. P., DUNSHEA, F. R., DOYLE, P. T. 2011. Selenium levels in cows fed pasture and concentrates or a total mixed ration and supplemented with selenized yeast to produce milk with supra-nutritional selenium concentrations. *J. Dairy Sci.* 94: 262-272.
- SUZUKI, K. T. 2005. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. *Journal of Health Science* 51: 107-114.

- SWENSSON, C., LINDMARK-MÅNSSON, H. 2007. The prospect of obtaining beneficial mineral and vitamin contents in cow's milk through feed. *Journal of Animal and Feed Sciences* 16 (Suppl. 1): 21-41.
- TAPIERO, H., TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57: 134-144.
- TASKER, J. B., BEWICK, T. D., CLARK, R. G., FRASER, A. J. 1987. Selenium response in dairy cattle. *N.Z. Vet. J.* 35: 139-140.
- TERRY, N., ZAYED, A. M., DE SOUZA, M. P., TARUN, A. S. 2000. Selenium in higher plants. *Annual Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 51: 401-432.
- UHM, S. J., GUPTA, M. K., YANG, J. H., LEE, S., LEE, H. T. 2007. Selenium improves the developmental ability and reduces the apoptosis in porcine parthenotes. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 1386-1394.
- VAN DER GRINTEN, P., BAAYEN, M. T., VILLALOBOS, L., DWINGER, R. H., 'T MANNETJE, L. 1992. Utilisation of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) pastures and dairy production in a high altitude region of Costa Rica. *Tropical Grasslands* 26: 255-262.
- VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B. 1985. Analysis of forages and fibrous feeds. Cornell University. Ithaca, NY. 165 p.
- VARGAS, E., SOLÍS, R., TORRES, M., MCDOWELL, L. 1992. Selenio y cobalto en algunos forrajes de Costa Rica: Efecto de la época climática y el estado vegetativo. *Agronomía Costarricense* 16 (2): 171-176.
- VELICHKO, O. A., LOSEVA, N. A., RYZHIY, E. L., SADOVNIKOVA, N. Y., SURAI, P. 2006. Effect of long-term consumption of Sel-Plex® and Yea-Sacc®1026

on reproductive health of dairy cows. Alltech's 22nd Annual Symposium, Lexington, KY.

WALDRON, M. R., WARD, T. L., SOCHA, M. T., OVERTON, T. R. 2004. Tissue selenium content and whole-blood glutathione peroxidase activity of lactating cows are increased by two organic forms of dietary selenium. *J. Dairy Sci.* 87 (Suppl. 1): 118.

WALKER, G. P., DUNSHEA, F. R., HEARD, J. W., STOCKDALE, C. R., DOYLE, P. T. 2010. Output of selenium in milk, urine, and feces is proportional to selenium intake in dairy cows fed a total mixed ration supplemented with selenium yeast. *J. Dairy Sci.* 93: 4644-4650.

WEISS, W. P. 2003. Selenium nutrition of dairy cows: comparing responses to organic and inorganic selenium forms. *In: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's 19th Annual Symposium.* (T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds). Nottingham University Press. Nottingham, UK. Pp: 333-343.

WEISS, W. P. 2005. Selenium sources for dairy cattle. *Proc. Tri-State Dairy Nutrition Conference.* Pp 61-72. Ft. Wayne, IN.

WEISS, W. P. 2011. Effects of micronutrients on the regulation of the immune system and its role in milk quality. *J. Dairy Sci.* 94 (E-Suppl. 1): 216.

WEISS, W. P., HOGAN, J. S. 2005. Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 4366-4374.

WEISS, W. P., TODHUNTER, D. A., HOGAN, J. S., SMITH, K. L. 1990. Effect of duration of supplementation of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 3187-3194.

WIEWIORA, W., BRZOSKA, F., BRZOSKA, B., PIETRAS, M. 2004. Iodine and selenium concentration in cows' milk and plasma and its relation to milk yield, mineral content and selected metabolic parameters. *Ann. Anim. Sci.* 4: 79-90.