

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

EL SELENIO EN LA INMUNIDAD DURANTE LA GESTACIÓN EN OVEJAS Y EXPRESIÓN GÉNICA DE FOLÍCULOS *IN VITRO*

MARÍA MONSERRAT LÓPEZ VELÁZQUEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

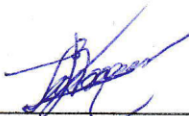
2021

La presente tesis titulada: **El selenio en la inmunidad durante la gestación en ovejas y expresión génica de folículos *in vitro*** realizada por la alumna: **Maria Monserrat López Velázquez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



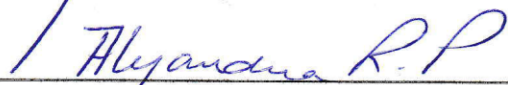
DRA. LEONOR MIRANDA JIMÉNEZ

ASESOR



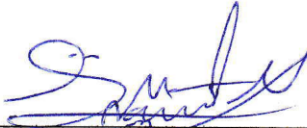
DR. ADRIAN RAYMUNDO QUERO CARRILLO

ASESORA



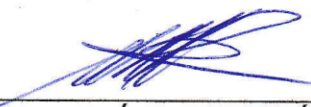
DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR



DR. SANTO MORALES VIDAL

ASESORA



DRA. MARTHA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo de 2021

EL SELENIO EN LA INMUNIDAD DURANTE LA GESTACIÓN EN OVEJAS Y EXPRESIÓN GÉNICA DE FOLÍCULOS *IN VITRO*

María Monserrat López Velázquez, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

El selenio es considerado en la ganadería ovina como oligoelemento esencial, aporta grandes beneficios al animal y brinda equilibrio fisiológico al organismo por su efecto antioxidante. Además, la importancia del selenio en el sistema inmune hace necesario su estudio en ovejas gestantes para conocer, de manera detallada, el funcionamiento celular y molecular tanto *in vivo* como *in vitro*. El presente estudio tuvo como objetivos: evaluar el efecto del “selenio orgánico” sobre células blancas y su efecto ante el estrés por manejo durante la gestación en ovejas; conocer su efecto sobre algunos parámetros productivos en la progenie; identificar genes expresados diferencialmente y asociados a procesos inmunes en folículos *in vitro*. Se realizaron cuatro experimentos (tres experimentos *in vivo* y un experimento *in vitro*): para los experimentos *in vivo* se utilizaron 27 ovejas adultas; las cuales, se asignaron al azar en dos grupos: 1) testigo, sin selenio más allá del disponible en el alimento (S-Se; n=11) con 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ de selenio; 2) tratado (C-Se; n=16) con adición de 0.3 mg animal⁻¹ día⁻¹ de “selenio orgánico” más 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ de selenio contenido en el alimento (concentración final: 0.54 mg animal⁻¹ día⁻¹). Para el experimento *in vitro* se utilizaron folículos de ovejas como unidad experimental: en el primer experimento, las células blancas que mostraron diferencias significativas fueron neutrófilos para tratamiento y tiempo ($P \leq 0.05$), al día nueve del desarrollo embrionario y los basófilos ($P \leq 0.05$), cuatro días después del inicio del tratamiento con “selenio orgánico”; en el segundo experimento se observaron diferencias significativas para neutrófilos ($P \leq 0.05$) a los días 42 y 104 del

desarrollo fetal y los basófilos ($P \leq 0.05$) durante todo el desarrollo fetal. Las corderas y no los corderos provenientes de madres C-Se presentaron aumento del peso al destete. En el tercer experimento, la adición de “selenio orgánico” disminuyó la frecuencia cardíaca (indicador de estrés), ante el estrés producido por el manejo cotidiano en ovejas durante todo el desarrollo pre-gestacional-gestacional y mantuvo estables el resto de constantes. En el cuarto experimento: análisis génico por microarreglos, se identificaron 2 538 transcritos diferencialmente expresados en folículos *in vitro* de ovejas, con 1 228 genes sobre-regulados y 1 310 genes sub-regulados. Algunos grupos principales de genes sobre-regulados están involucrados en procesos biológicos como de transcripción y regulación positiva de migración celular; en componentes celulares como citoplasma y núcleo; en funciones moleculares como proteínas de unión y ADN. Se identificaron 41 vías biológicas; de entre éstas, ocho vías están relacionadas con el sistema inmunológico. Se concluye que el selenio puede ser alternativa para disminuir el estrés por manejo, regular células blancas y mejorar la calidad del sistema inmunológico en ovejas gestantes y folículos *in vitro*.

Palabras clave: selenio, inmunidad, gestación, folículos, genes, microarreglos.

SELENIUM IN IMMUNITY DURING EWES GESTATION AND GENE EXPRESSION OF *IN VITRO* FOLLICLES

Maria Monserrat López Velázquez, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

The selenium is considered an essential trace element in farming sheep, it provides great benefits to the animal and in physiological or homeostasis balance due to its antioxidant effect. Also, selenium is important for the immune system, for that, it is a priority to study through ewe gestation to define in detail the cellular and molecular functioning, both *in vivo* and *in vitro*. The present study had as objectives: to evaluate the "organic selenium" effect on white blood cells, on handling stress during ewe gestation; to know some productive parameters on the progeny, and to identify differentially expressed genes associated with immune processes in *in vitro* follicles from ewes. Four experiments were performed (three *in vivo* and one *in vitro*). For three experiments, 27 adult ewes were used, ewes were randomized into two groups: 1) control, without extra selenium (S-Se; n = 11), only 0.24 mg animal⁻¹ day⁻¹ (contained naturally in the diet); 2) treated group (C-Se; n = 16) with 0.3 mg animal⁻¹ day⁻¹ of organic selenium plus 0.24 mg animal⁻¹ day⁻¹ from diet (final concentration: 0.54 mg animal⁻¹ day⁻¹). For the *in vitro* experiment, follicles from ewes were cultured with selenium. In the first experiment, neutrophils showed differences by treatment and time ($P \leq 0.05$) at day nine of embryonic development; basophils, four days after starting the treatment with "organic selenium showed significant differences ($P \leq 0.05$). In the second experiment, the neutrophils showed differences ($P \leq 0.05$) at days 42 and 104 of fetal development and basophils ($P \leq 0.05$) throughout all fetal development. The female lambs but not male lambs

from mothers C-Se had increase in weaning weight. In the third experiment, organic selenium administration decreased heart rate (indicator of stress), before the stress produced by daily management throughout pre-gestational and gestational development in ewes. In the fourth experiment, gene microarray analysis of *in vitro* follicles, identified 2 538 differentially expressed transcripts: 1 228 up-regulated and 1 310 down-regulated genes. Some main groups of up-regulated genes were involved: for biological processes such as transcription and positive regulation of cell migration; in cellular components such as cytoplasm and nucleus; in molecular functions such as binding proteins and DNA. Also, 41 pathways were identified; of these, eight pathways associated to immune system. It was concluded that selenium might be an alternative to decrease daily handling stress, to regulate white blood cells, and to improve immune system quality in ewe gestation and in *in vitro* follicles.

Key words: selenium, immunity, gestation, follicles, genes, microarray.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo financiero proporcionado para efectuar mis estudios de doctorado.

Al **Colegio de Postgraduados** y al **Programa de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería** por la oportunidad brindada para mi formación científica.

A la **Dra. Leonor Miranda Jiménez**, por aceptar ser mi consejera durante mi formación académica y profesional, por los conocimientos, compromisos, consejos, orientación y sobre todo por brindarme su apoyo incondicional y amistad en momentos especiales para la culminación de mis estudios de doctorado.

A los **Dres. Adrián Raymundo Quero Carrillo y Santo Morales Vidal**, por el tiempo, aportaciones, recomendaciones y asesoramiento en el trabajo de investigación.

A las **Dras. Alejandrina Robledo Paz y Martha Hernández Rodríguez**, por su valioso tiempo, dedicación, aportaciones, asesoramiento, apoyo y conocimientos transmitidos durante la etapa experimental de mi trabajo de investigación y mi formación doctoral.

Gracias al **Dr. Adrián Gloria Trujillo**, por su valiosa amistad, su apoyo brindado en el análisis de microarreglos, recomendaciones y observaciones en la redacción de esta tesis.

Al **Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca**, por sus aportaciones, comentarios y observaciones realizadas para la redacción de esta tesis.

A la **Dra. Yalbi Itzel Balderas Martínez**, por su apoyo y conocimiento brindado en el análisis de redes de genes.

A los productores **Andrés, Enrique y Roberto** por prestar sus animales para la investigación.

A **mis compañeros, amigos, profesores**, por su apoyo, compañía durante el trabajo de campo y mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

DEDICATORIA

A **DIOS**, no tengo palabras para agradecer tu infinita bondad y misericordia al darme la oportunidad de llegar a este momento tan especial y dejarme cumplir una meta más en la vida.

A mi hijo **Farid Asael**, por ser el motor de mí vida, mi motivación para seguir adelante.

A mi mamá **Reyna Velázquez Calzada**, por apoyarme siempre para culminar y alcanzar las metas que tengo en la vida, por tus consejos y por estar conmigo en todo momento.

A mi papá **Cruz López Ayala**, por apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis hermanos: **José Cruz y Martín Santiago**.

A mi tía **Rosy**.

A mi familia **primos (a) Adri, Lupita, cuñadas y sobrinos (a)**, son demasiados para escribir sus nombres por lo que les pido una disculpa.

A cada uno de ustedes gracias por su gran amistad, apoyo, consejos, por convivir y compartir momentos especiales en la vida.

Por último, solo me queda agradecer y dedicar esta tesis a todas las personas que hicieron posible este trabajo, siempre los llevaré en mi mente por ser parte de mi vida y de todo corazón les deseo éxito y bendiciones en su vida.

Con Amor y cariño

M.M.L.V.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	v
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivos	3
Hipótesis	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Inmunidad	5
Inmunidad innata	6
Inmunidad adquirida	10
Inmunidad gestacional	13
Selenio	17
Selenio en la inmunidad.....	18
Selenio en la reproducción y gestación.....	20
Selenio y su acción ante el estrés	22
Selenio y la expresión génica.....	23
Selenoproteínas	24
Microarreglos o Microarrays	27
Literatura citada	30
CAPÍTULO I. LEUCOCITOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVEJAS COMO RESPUESTA A “SELENIO ORGÁNICO”	38
1.1 RESUMEN	38
1.2 ABSTRACT.....	39
1.3 INTRODUCCIÓN	39
1.4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	41

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
1.6 CONCLUSIONES	48
1.7 LITERATURA CITADA	49
CAPÍTULO II. ACCIÓN DEL SELENIO SOBRE LEUCOCITOS DE OVEJAS GESTANTES Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN SU DESCENDENCIA.....	
2.1 RESUMEN	51
2.2 ABSTRACT.....	52
2.3 INTRODUCCIÓN	53
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	54
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
2.6 CONCLUSIONES	63
2.7 LITERATURA CITADA	63
CAPÍTULO III. RESPUESTA AL “SELENIO ORGÁNICO” ANTE EL ESTRÉS: PARÁMETROS FISIOLÓGICOS EN OVEJAS GESTANTES	
3.1 RESUMEN	68
3.2 INTRODUCCIÓN	69
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
3.5 CONCLUSIONES	80
3.6 LITERATURA CITADA	80
CAPÍTULO IV. EFECTO DEL SELENIO (SELENOMETIONINA) SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y VÍAS ASOCIADAS A LA INMUNIDAD EN FOLÍCULOS <i>IN VITRO</i> DE OVEJAS.....	
4.1 RESUMEN	83
4.2 INTRODUCCIÓN	84
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	86
4.4 RESULTADOS.....	89

4.5 DISCUSIÓN	100
4.6 CONCLUSIONES	105
4.7 LITERATURA CITADA	106
CONCLUSIONES GENERALES.....	110

LISTA DE CUADROS

Introducción general

Cuadro 1. Selenoproteínas y sus funciones. 25

Capítulo II

Cuadro 1. Medias de parámetros productivos de corderos nacidos, como efecto a la aplicación de “selenio orgánico” antes de la inseminación artificial (IA) y de la gestación (media \pm error estándar)..... 62

Capítulo III

Cuadro 1. Valores ambientales registrados durante el periodo de estudio en la comunidad de Chiautla, Estado de México. 72

Cuadro 2. Valores de los parámetros fisiológicos de ovejas a las que se les adicionó “selenio orgánico” en levadura. 79

Capítulo IV

Cuadro 1. Cebadores utilizados para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). 89

Cuadro 2. Diez procesos biológicos principales relacionados con el sistema inmunológico de folículos *in vitro* expuestos a selenometionina. 93

LISTA DE FIGURAS

Introducción general

Figura 1. Imagen de la muestra del escaneo del microarreglo de ratón que contiene más de 20000 genes, utilizado para determinación del nivel de expresión génica de folículos *in vitro* expuestos a “selenio orgánico” 28

Capítulo I

Figura 1a y 1b. Comportamiento de linfocitos y neutrófilos durante y después de la aplicación de “selenio orgánico” en ovejas locales (raza indefinida). 45

Figura 2a y 2b. Comportamiento de basófilos y eosinófilos durante y después de la aplicación de “selenio orgánico” en ovejas locales (raza indefinida). 47

Capítulo II

Figura 1. Número promedio de neutrófilos por campo microscópico, en frotis sanguíneos obtenidos de ovejas con aplicación de “selenio orgánico” antes de la IA y de la gestación. 58

Figura 2. Número promedio de basófilos por campo microscópico, en frotis sanguíneos obtenidos de ovejas con aplicación de “selenio orgánico” antes de la IA y de la gestación. 59

Capítulo III

Figura 1. Concentración sérica de selenio en ovejas gestantes a las que se les adicionó “selenio orgánico” en levadura. 75

Figura 2. Concentración sérica de cortisol en ovejas gestantes a las que se les adicionó “selenio orgánico” en levadura. 77

Capítulo IV

Figura 1. Clasificación Ontología de Genes (GO) de genes expresados diferencialmente por efecto de selenometionina en folículos *in vitro* de ovejas. 92

Figura 2. Análisis de la vía Enciclopedia de Kioto sobre genes y genomas (KEGG) de genes expresados diferencialmente presentes como efecto de la selenometionina en folículos *in vitro* de ovejas. 97

Figura 3. Red entre genes y vías involucradas en procesos inmunes de folículos *in vitro* por efecto de selenometionina..... 99

Figura 4. Tres genes validados por RT-qPCR de folículos *in vitro* de ovejas por efecto de selenometionina. 1000

INTRODUCCIÓN GENERAL

El sistema inmunológico es una organización de células y moléculas con funciones especializadas en la defensa de los organismos vivos contra microorganismos extraños (Delves *et al.*, 2017). En general, la función del sistema inmunológico es mantener al organismo en homeostasis. Cuando un animal está gestante requiere de adaptaciones del sistema inmune que permitan tolerar el feto semialogénico, resultado de la recombinación genética de sus padres (Robertson *et al.*, 2015) y mantener el equilibrio inmunológico (Arias y Villegas, 2010).

Durante la gestación se crean mecanismos de tolerancia inmunológica que habilitan al embrión para desarrollarse en el útero, como la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras, células asesinas naturales NK, células dendríticas y la actividad de macrófagos, entre otros (Arias y Villegas, 2010; Vázquez-Rodríguez *et al.*, 2011; Barañao, 2011; Martínez *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2015). Todos estos mecanismos son interdependientes y en conjunto, evitan el rechazo del embrión y feto. También se debe considerar que todas las condiciones de estrés estimulan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que producen estrés oxidativo y generan daños a las células u organismo perdiéndose el equilibrio homeostático.

Los antioxidantes suplementados pueden reducir potencialmente el daño inducido por las ROS y ayudar al sistema inmunológico de la madre y a su descendencia a mantener un equilibrio homeostático; en especial el selenio, como antioxidante que protege las células contra radicales libres y elemento esencial, con propiedades necesarias para el adecuado funcionamiento biológico-fisiológico de muchos organismos (Kieliszek, 2019).

El selenio tiene el potencial de reducir daños y aumentar la capacidad de reparación del ADN (Kieliszek y Błażej 2013; Kieliszek *et al.*, 2018). El selenio y las selenoproteínas pueden mantener el estado redox intracelular y proteger a las células sanas del daño oxidativo inducido por las ROS (Hariharan y Dharmaraj, 2020).

Se conoce que los folículos y ovocitos de baja calidad tienen capacidad reducida para su posterior desarrollo (Liu *et al.*, 2012). El suplemento con selenio, tanto inorgánico como orgánico no solo puede mejorar el desarrollo folicular sino también el embrionario (Yang *et al.*, 2019). El selenio influyó en la expresión génica durante la maduración del ovocito de yak (bovino nativo de Asia Central) y benefició la formación y calidad de los blastocistos (Xiong *et al.*, 2018).

El consumo de selenio influye en la activación y funciones de las células T y B del sistema inmune (Hoffmann *et al.*, 2010). El selenio es un inmunoestimulador que modula la inflamación y la inmunidad, influye en procesos proliferativos de células T y diferenciación de las células T auxiliares, interviene en la actividad de las células asesinas naturales (NK) y en otras funciones de las células inmunitarias innatas (Huang *et al.*, 2012). En condiciones deficientes de selenio, las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas se ven afectadas al disminuir la función de los neutrófilos, la producción de anticuerpos, la proliferación de linfocitos T y B en respuesta a mitógenos y la citodestrucción por linfocitos T y células asesinas naturales (Avery y Hoffmann, 2018; Hefnawy y Tortora-Perez, 2010).

El selenio también actúa a nivel transcripcional y postranscripcional (Labunskyy *et al.*, 2014; Lammi y Qu, 2018). Existe poca información sobre su efecto sobre el sistema inmune durante la gestación en ovejas y el efecto de “selenio orgánico” *in vivo* en ovejas gestantes,

así como en expresión de genes relacionados con la inmunidad en folículos *in vitro*. Por consiguiente, es necesario conocer el efecto del “selenio orgánico”, lo cual permitirá saber si el selenio puede: mejorar la calidad del sistema inmunológico de la hembra gestante y folículos *in vitro*; disminuir el estrés de la hembra por el manejo cotidiano; ayudar a las ovejas a presentar salud óptima por mejorar el sistema inmune durante la gestación y, por último, determinar si mejora los parámetros productivos de la descendencia.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos del “selenio orgánico” sobre las células inmunes de ovejas durante la gestación, conocer algunos parámetros productivos en su progenie e identificar genes asociados a procesos inmunes en folículos *in vitro*.

Objetivos específicos

- Evaluar la concentración de células sanguíneas blancas durante el desarrollo embrionario en ovejas, en respuesta al “selenio orgánico”.
- Determinar la concentración de células sanguíneas blancas durante el desarrollo fetal en ovejas, en respuesta al “selenio orgánico” y conocer algunos parámetros productivos de los corderos nacidos de estas ovejas.
- Evaluar el efecto del “selenio orgánico” ante el estrés por manejo: cortisol, parámetros fisiológicos (temperatura rectal, frecuencia cardíaca y respiratoria) en ovejas gestantes.
- Identificar genes asociados a los procesos inmunes en respuesta al selenio.

Hipótesis

Hipótesis general

En ovejas suplementadas con “selenio orgánico” se incrementa el número de células inmunes, aumenta el peso de los corderos nacidos y, en folículos *in vitro*, se modula la expresión de genes asociados a procesos inmunes.

Hipótesis específicas

- El suplemento con “selenio orgánico” incrementa el número de células sanguíneas blancas durante el desarrollo embrionario.
- El suplemento con “selenio orgánico” incrementa el número de células sanguíneas blancas durante el desarrollo fetal.
- El suplemento con “selenio orgánico” a ovejas, antes de la gestación, disminuye el estrés por manejo.
- La selenometionina (SeMet) aumenta y modula el nivel de transcripción de genes asociados al sistema inmune en folículos *in vitro*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Inmunidad

El sistema inmunológico es una organización de células y moléculas con funciones especializadas en la defensa contra microorganismos extraños al organismo (Delves *et al.*, 2017). Está constituido por órganos, sustancias químicas y células, como leucocitos o glóbulos blancos, aunado a otros mecanismos inmunes.

Hay dos tipos de respuesta inmune; las cuales, se basan en parte, en su especificidad por el antígeno: la respuesta innata (natural) y la respuesta adaptativa (específica), respuestas que juntas brindan protección efectiva (Snyder, 2017) contra sustancias extrañas al organismo.

El sistema inmunológico reacciona con dos funciones básicas: el **reconocimiento** de sustancias y/u organismos extraños que han penetrado las defensas externas y la **eliminación** de agentes infecciosos, mediante diversas células y moléculas que actúan en conjunto para neutralizar la amenaza (Delves *et al.*, 2017).

La respuesta inmunitaria puede dividirse desde el punto de vista funcional, en tres fases: fase de reconocimiento del antígeno, fase de activación de la respuesta y fase efectora. Las capacidades de reconocimiento son altamente específicas y permiten que se desarrollen respuestas inmunes contra diversos antígenos extraños y previenen el desarrollo de respuestas inmunes a los antígenos propios. Las respuestas inmunes presentan mecanismos efectores para eliminar o neutralizar el antígeno; mientras que, la inmunidad adaptativa tiene la característica adicional de memoria. Las capacidades funcionales de reconocimiento y respuesta del sistema inmunológico son componentes clave de las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas (Snyder, 2017).

Inmunidad innata

La inmunidad innata o natural comprende a un grupo de mecanismos de primera línea de defensa inespecíficos; los cuales, actúan inmediatamente o en un período de tiempo corto después de la exposición a antígenos (Snyder, 2017). El sistema inmunológico innato está compuesto por componentes estructurales, mecanismos y sistemas de barreras de defensas que están presentes antes de la manifestación de la infección y que reconocen moléculas que se encuentran con frecuencia en patógenos invasores. Estos elementos de la inmunidad innata permiten la contención de organismos mientras se genera o aumenta la respuesta inmune específica (Actor, 2012; Snyder, 2017). Algunos incluyen:

- Barrera anatómica (piel, membranas mucosas).
- Barrera fisiológica (temperatura, pH bajo, mediadores químicos, proteínas solubles como lisozimas, interferones).
- Barreras fagocíticas y endocíticas (monocitos, macrófagos y neutrófilos).
- Barreras inflamatorias (fuga de líquido vascular).
- Células de la inmunidad innata: monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células dendríticas y células asesinas naturales (Actor, 2012; Snyder, 2017).

Monocito/macrófago: Los monocitos son células inmaduras circulantes en el torrente sanguíneo, se establecen en los tejidos donde pasan a ser macrófagos. Dependiendo del tejido en el que se encuentren reciben diferentes nombres; microglia, histiocito, osteoclasto, macrófago alveolar y célula de Kupffer. Los macrófagos son fagocíticos con capacidad de matar e ingerir microbios, pueden generar citocinas y quimiocinas al comprometerse con sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR, pattern recognition receptor; Delves *et al.*,

2017); también, contribuyen en la eliminación de sustancias de desecho de los tejidos. Tanto los monocitos como los macrófagos son importantes iniciadores de la respuesta inmunitaria contra la invasión viral, se convierten en la célula predominante dentro de un foco de infección. Los macrófagos activados tienen mayor actividad quimiotáctica, actividad fagocítica y poder digestivo (Burrell *et al.*, 2017). También secretan mediadores proinflamatorios en respuesta a bacterias y productos bacterianos, incluidos IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α (Actor, 2012).

Los macrófagos y mastocitos son células residentes en los tejidos, son las primeras células inmunitarias dedicadas a detectar la presencia de patógenos, en la detección de infecciones y en la amplificación de las respuestas inmunitarias, a través de la producción de citocinas, quimiocinas y otros mediadores solubles como aminos y lípidos que facilitan la migración de células inmunes (como los neutrófilos) al sitio de una infección (Delves *et al.*, 2017). En el ganado ovino sano, los monocitos representan alrededor de 3% de los leucocitos sanguíneos (Ramírez, 2006).

Neutrófilos: Células altamente fagocíticas, especializadas en acechar y capturar bacterias extracelulares y levadura (Delves *et al.*, 2017), se han considerado como células efectoras de vida corta del sistema inmunitario innato, con capacidad limitada para la actividad biosintética, tiene actividad principal en la resistencia contra patógenos extracelulares e inflamación aguda, contribuyen a detectar y eliminar agentes extraños, liberan redes de ácido desoxirribonucleico (ADN); las cuales, son conocidas como trampas extracelulares de neutrófilos, que inmovilizan a los patógenos. También son mediadores en los procesos de inflamación y actúan para liberar citocinas, además, participan en el reclutamiento y la comunicación con macrófagos, linfocitos T y linfocitos B; similarmente, coordinan la

respuesta inmune y contribuyen a la reparación de tejidos dañados (Mantovani *et al.*, 2011; Mócsai, 2013). En rumiantes y particularmente en ovinos representan entre 30 % a 32 % de neutrófilos del total de los leucocitos (Ramírez, 2006).

Basófilos y eosinófilos. Tienen respuesta frente a parásitos, sus gránulos especializados contienen sustancias como histamina, ADNasas, lipasas, peroxidasas, proteasas y otras proteínas citotóxicas; además, secretan mediadores inflamatorios como leucotrienos, prostaglandinas y diversas citocinas; las cuales, se liberan en presencia de alérgenos y sobre los parásitos, para atacar y romper la dura cutícula externa, proceso denominado desgranulación (Delves *et al.*, 2017). En ovejas, los eosinófilos se reportan como 8 % del total de leucocitos en sangre periférica y con respecto a basófilos, alrededor del 0.5 % (Ramírez, 2006).

Células asesinas naturales (NK). Linfocitos grandes con gránulos citoplasmáticos, estos gránulos contienen perforina, proteína que puede producir poros en las membranas plasmáticas; además, granzimas, que pueden administrarse a células diana para iniciar la apoptosis. También producen una variedad de citocinas que se superponen a las producidas por las células T activadas. Las células NK tienen propiedades funcionales que se asemejan a subconjuntos de linfocitos T activados (Biron, 2016).

Las células NK expresan un repertorio de receptores activadores e inhibidores calibrado para asegurar la auto-tolerancia, al tiempo que permite la eficacia contra ataques como la infección viral y desarrollo de tumores. También pueden montar una forma de memoria inmunológica específica de antígeno (Vivier *et al.*, 2011). Las células NK desempeñan un papel esencial en la defensa, al estimular la muerte de células infectadas por apoptosis y al

preparar la respuesta adaptativa mediante la secreción de varias citocinas, incluido interferón γ , factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-4 e IL-13 (Burrell *et al.*, 2017). En ovinos se encuentra entre 3 % y 9 % de células asesinas naturales del total de los leucocitos y, con respecto a los linfocitos circulantes, representan entre el 7.5 % y 12.6 % (Elhmoouzi-Younes *et al.*, 2010).

Células dendríticas (CD). Se desarrollan a partir de un precursor linfoide, circulan como células similares al plasma y luego migran al tejido linfoide. Son células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, secretan niveles elevados de Interferon (IFN) de tipo 1 y tienen funciones clave en la defensa temprana contra infecciones virales (Biron, 2016).

Las CD tienen largas extensiones membranosas para estudiar el entorno local y son fagocíticas (McDonald y Levy, 2019), su función principal es el muestreo del entorno tisular mediante macropinocitosis continua y fagocitosis de material extracelular (Delves *et al.*, 2017). Además, vinculan las respuestas inmunes innatas a adaptativas después de la activación por microbios, asimismo expresan una variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que les permiten responder a los microbios mediante la captación de antígenos y la secreción de citocinas.

Las células dendríticas (CD) activadas captan rápidamente el antígeno y luego se dirigen a los ganglios linfáticos; durante su migración a los ganglios linfáticos, las CD maduran y se convierten en células presentadoras de antígeno (APC) eficientes. Una vez en el ganglio linfático, las CD expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras, como B7 e IL-12p70 y presentan antígeno a las células T, induciendo su diferenciación en células T efectoras (Th1) (McDonald y Levy, 2019).

El sistema inmunológico innato también puede distinguir entre microbios intracelulares (virus) y extracelulares (bacterias extracelulares) e iniciar diferentes tipos de respuestas; lo anterior, para controlarlos mediante mecanismos de reconocimiento intrínsecos y extrínsecos de células en células infectadas o no infectadas, respectivamente. El sistema innato puede actuar a través de interacciones PRR-PAMP y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP)], inicia la inflamación aguda y otros efectos citotóxicos y no citotóxicos en los microbios; también, puede activar el sistema del complemento a través de la vía alternativa o de la manosa/lectina donde forma un complejo de ataque a la membrana que mata a los microbios al perforar sus membranas celulares. Por último, el sistema inmunitario innato puede iniciar y mantener respuestas inmunitarias adaptativas, principalmente contra los microbios (Snyder, 2017). En general, tras la activación, las células del sistema inmune innato se regulan mediadores inflamatorios e incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión que activan el sistema inmune adaptativo (Ciraci *et al.*, 2012).

Inmunidad adquirida

La inmunidad adaptativa o adquirida es un grupo de segunda línea de respuestas específicas que ocurren días o semanas después de la exposición a antígenos microbianos. Las respuestas adaptativas son muy específicas de los antígenos de los géneros o especies particulares de microbios que las inducen, y la respuesta es recordada por el sistema inmunitario. Las defensas y mecanismos de la inmunidad adaptativa incluyen (1) inmunidad mediada por células, linfocitos T contra patógenos intracelulares, y (2) inmunidad humoral, mediada por linfocitos B contra patógenos y toxinas extracelulares (Snyder, 2017).

La respuesta inmune adaptativa tiene tres características que la diferencian de la inmunidad innata:

- Especificidad inmunológica, capacidad de las células de la respuesta adaptativa para reconocer diferencias sutiles en patógenos.
- Auto y no auto-discriminación, capacidad de reconocer y actuar contra moléculas extrañas mientras permanece inactivo frente a sí mismo.
- Memoria, el potencial para recordar un encuentro previo con un patógeno y reaccionar de manera amplificada al reexponerse al mismo patógeno (Moticka, 2016).

Linfocitos T: Son pequeñas células no granulares, se originan en la médula ósea y migran al timo, donde se someten a procesos de diferenciación, selección y maduración antes de salir a la periferia como linfocitos efectores (Snyder, 2017). Las células T se pueden subdividir en tres subconjuntos amplios: T auxiliares (Th), T citotóxicos (Tc) y T reguladores (Treg). Las células T -auxiliares (Th) ayudan a las células B a producir anticuerpos, las células T -citotóxicas (Tc) matan las células infectadas por virus y las células T -reguladoras (Treg) controlan acciones de otras células T (Delves *et al.*, 2017). Los linfocitos T expresan gran diversidad de receptores para antígenos capaces de reconocer amplia variedad de sustancias extrañas (Díaz *et al.*, 2013). En ovinos los linfocitos constituyen aproximadamente 60% de la población de leucocitos (Ramírez, 2006).

Las **células B** emergen de la médula ósea y migran directamente a los tejidos linfoides, desempeñan funciones importantes en el sistema inmunitario, actúan como células presentadoras de antígenos, secretan citocinas, establecen la arquitectura de los órganos linfoides, e influyen en la acción de otras células, y como las células productoras de

anticuerpos del sistema inmunitario adaptativo (Merlo y Mandik-Nayak, 2013). Otra función de las células B es la diferenciación hacia células B de memoria, estas células B de memoria producen anticuerpos de alta afinidad e isotipos que protegen permanentemente al recordar los antígenos que las estimularon, el tipo de respuesta (de IgG, IgA o IgE) y los patrones de producción de citocinas eficientes en la resolución de la infección inicial (Prieto *et al.*, 2013).

El desarrollo de los linfocitos B se produce en dos fases, una fase independiente del antígeno en los tejidos linfoides primarios, seguida de una fase dependiente del antígeno en los tejidos linfoides secundarios. Después de la fase de desarrollo independiente del antígeno, los linfocitos B expresan IgM e IgD en su superficie, lo que significa un linfocito B maduro. En la fase dependiente de antígeno, los linfocitos B maduros activados por antígeno se diferencian en células plasmáticas secretoras de IgM o cambian a otro isotipo de anticuerpo (Snyder, 2017).

La **inmunidad celular**, respuesta inmune mediada por la acción de linfocitos T, constituye el principal mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares promoviendo la destrucción de éstos (Toche, 2012). Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones principales: linfocitos TCD4⁺ y linfocitos TCD8⁺.

Las células TCD4⁺ actúan como células "auxiliares" que proporcionan señales que inducen a las células B o a las células TCD8⁺ a proliferar en respuesta a una célula presentadora de antígeno profesional (APC). Las señales proporcionadas por las células CD4⁺ involucran moléculas de superficie auxiliares que interactúan con moléculas de ligando afines en la superficie de las células TCD8⁺ o células B que responden al antígeno. Las células CD4⁺ se pueden dividir en varios subtipos definidos por citocinas específicas

producidas y funciones realizadas, incluidas las células Th1, Th2, Th9, Th17, TFH y Treg (Wherry y Masopust, 2016).

Los linfocitos CD8⁺, cuando se activan, se convierten en linfocitos T citotóxicos (CTL), la célula efectora del linaje CD8⁺. Los CTL inician una respuesta local que incluye dos componentes, un ataque lítico sobre las células diana que portan un epítipo extraño y la producción de citocinas que pueden atraer células inflamatorias al sitio local, lo que resulta en un ataque indirecto sobre el patógeno (Wherry y Masopust, 2016). Estas células T citotóxicas atacan directamente a las células y destruyen aquellas que son malignas o infectadas con virus (Cox *et al.*, 2013).

La **inmunidad humoral** es mediada por anticuerpos o inmunoglobulinas que son secretados por las células B (Toche, 2012). Hay cinco isotipos de inmunoglobulina (IgM, IgD, IgA, IgE, IgG), cada uno con propiedades y funciones únicas. Las diferentes clases responden a diferentes tipos de antígenos y tienen diferentes capacidades para activar varias vías para neutralizar y eliminar patógenos (Merlo y Mandik-Nayak, 2013).

Por tanto, la inmunidad humoral depende de las células B, mientras que la inmunidad celular depende de las células T.

Inmunidad gestacional

La gestación requiere adaptaciones en los sistemas inmunes maternos, innato y adaptativo, que permitan tolerar al feto “semialogénico”, resultado de la recombinación genética de sus padres (Robertson *et al.*, 2015). La gestación en sí misma constituye un acontecimiento de equilibrio inmunológico (Arias y Villegas, 2010).

Durante la gestación se crean mecanismos de tolerancia inmunológica que le permiten al embrión desarrollarse en el útero. Todos estos mecanismos son interdependientes y en conjunto evitan el rechazo del embrión y feto. Entre los mecanismos que regulan el sistema inmunológico materno durante la gestación, para generar una respuesta tolerogénica se encuentran: factores fetales, maternos y placentarios, la generación de anticuerpos y de proteínas inmunomoduladoras, como las hormonas sexuales femeninas (estrógenos, progesterona), la producción de citocinas, el balance de citocinas Th1/Th2 de células T, la actividad de ciertas células inmunocompetentes o la actividad inmunosupresora de los linfocitos T reguladores, las células NK y las células dendríticas, el efecto de la apoptosis y la actividad de los macrófagos, entre otros mecanismos; por parte del embrión (Arias y Villegas, 2010; Vázquez-Rodríguez *et al.*, 2011; Barañao, 2011, Martínez *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2015).

Durante el primer trimestre se mantiene un patrón Th2, al final del tercer trimestre predomina un patrón de citocinas tipo Th1, este cambio en el perfil de citocinas es necesario para el inicio del parto (Martínez *et al.*, 2011). La exposición prolongada a las citocinas Th1 es perjudicial para el embarazo, mientras que las citocinas Th2 son necesarias para estimular la invasión del blastocisto y la formación de vasos sanguíneos durante el período de implantación (balance de las citocinas Th1/Th2) y el desequilibrio entre estas puede ser responsable de provocar abortos espontáneos (Čerkienė *et al.*, 2010).

Los leucocitos maternos están presentes durante toda la gestación, sin embargo, las frecuencias de la población cambian, en el primer trimestre (implantación y la invasión/remodelación del trofoblasto), las células NK deciduales (dNK) comprenden la mayoría (~70 %) de las células inmunitarias, seguida de los macrófagos (20-25 %) y las células T (3-10

%) (Manaster y Mandelboim, 2010; Kwan *et al.*, 2014; Nancy y Erlebacher, 2014; Liu *et al.*, 2017).

Las células NK uterinas (uNK) desempeñan un papel importante en la modulación de la invasión del trofoblasto, la angiogénesis y la remodelación vascular, producen elevadas concentraciones de factores de crecimiento, factores angiogénicos y citocinas, estas regulan el desarrollo placentario, la implantación y aumenta la disponibilidad de sangre materna en el sitio de implantación (Liu *et al.*, 2017; Ander *et al.*, 2019), asimismo, la función principal de células uNK es ayudar en el desarrollo fetal y proteger al feto contra patógenos externos (Manaster y Mandelboim, 2010). La ausencia de células uNK en la gestación en ratones se asocia con menor viabilidad del feto y formación anormal de la estructura decidual y arterias espirales en el sitio de implantación (Hofmann *et al.*, 2014).

Los macrófagos persisten durante toda la gestación, sus funciones están asociados con la presentación de antígenos a linfocitos T, degradan la matriz extracelular, regulan la apoptosis y fagocitosis de bacterias, y restos celulares que se producen durante la implantación. Estas células son fundamentales para defensa del hospedador, invasión del trofoblasto, remodelación vascular, homeostasis del tejido uterino y modulación inmunitaria (Bulmer *et al.*, 2010; Abumaree *et al.*, 2012; Svensson-Arvelund *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Al término del embarazo, los macrófagos tienen bajos niveles de moléculas coestimuladoras de células T (CD80/ CD86), producen indolamina 2,3-dioxigenasas a las que se les ha atribuido acción en la prevención de células T maternas (dificultan la activación de las células T) y catabolizan el triptófano (Vacca *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011; Grozdics *et al.*, 2014). También pueden tener un papel antimicrobiano en la protección del feto contra las infecciones (Tang *et al.*, 2015).

Las células dendríticas (CD) constituyen solo el 1 - 2 % de todos los leucocitos presentes en la decidua materna, juegan un papel importante en el mantenimiento del embarazo al inducir tolerancia hacia el feto, regulan la diferenciación de las células del estroma y las respuestas vasculares asociadas con el proceso de implantación (Lee *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2016). Tanto los macrófagos deciduales y las células dendríticas son importantes para la defensa contra las infecciones y pueden ser fundamentales tanto en la remodelación de la arteria espiral como en la inmunomodulación durante el embarazo (Liu *et al.*, 2017).

Los neutrófilos aumentan las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) y especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la gestación, con aumento continuo durante el progreso de la misma (Giaglis *et al.*, 2016). Mientras la fagocitosis de neutrófilos es alterada durante la gestación, esta función fagocítica disminuida puede ser parte de la inmunosupresión materna, que es esencial para la protección del feto semiallogénico (Lampé *et al.*, 2015).

Los recuentos de eosinófilos y basófilos no se ven afectados por la gestación (Abu-Raya *et al.*, 2020). Mientras que los monocitos al igual que los neutrófilos aumentan durante la gestación y disminuye su función fagocítica, *comenzando* en el primer trimestre (Koldehoff *et al.*, 2013; Lampé *et al.*, 2015). Una gestación sana se caracteriza por condición proinflamatoria, con aumento y activación de monocitos, así como con mayor número de monocitos intermedios y disminución en el número de monocitos clásicos (maduración de los monocitos) (Faas y Vos, 2017). Asimismo, estas células contribuyen a la protección del feto en crecimiento de los microorganismos, ayudan al desarrollo de la placenta al promover la invasión del trofoblasto, la remodelación vascular y el proceso de parto (Tang *et al.*, 2015).

Dentro del sistema inmunológico adaptativo, las células TCD8⁺, las células T efectoras CD4⁺, las células T reguladoras Foxp3⁺ y las células T supresoras CD4⁺HLA-G⁺ son actores potenciales en el mantenimiento de la tolerancia inmune hacia el feto semialogénico, expresan actividad inmunosupresora y mantienen la homeostasis del sistema (Xing y Qi, 2010; Erlebacher, 2010; Liu *et al.*, 2017). Algunas células T protegen a la placenta del rechazo inmunológico y facilitan la implantación del embrión (Nancy y Erlebacher, 2014).

Las células B pueden producir anticuerpos, captar, procesar y presentar antígenos, así como producir varias citocinas que influyen en la inmunidad, estas células participan activamente tanto en el bienestar del embarazo como en las patologías asociadas al embarazo. Las células B se pueden dividir en dos subpoblaciones diferentes: células B1 y B2. Las células B2 son responsables de la producción de anticuerpos protectores, mientras que B1 parece ser la fuente de autoanticuerpos relacionados con las complicaciones del embarazo como abortos (Muzzio *et al.*, 2013).

El selenio

El selenio fue descubierto por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius, (1817); es uno de los elementos químicos de la tabla periódica y se considera no metal, es esencial para diversos organismos y regula propiedades necesarias para el buen funcionamiento biológico, fisiológico de muchos organismos.

El selenio es incorporado en pequeñas cantidades, por ser tóxico a niveles elevados. Existen dos formas para ser incorporado a la dieta: selenio inorgánico (selenito y selenato) y “selenio orgánico” (selenometionina) (SeMet), selenocisteína (SeCys) y levadura selenizada (Se-levadura). La levadura selenizada contiene más de 60 tipos únicos de selenio

(Arnaudguilhem *et al.*, 2012); en la industria comercial existe extensa variación de tipos de levadura selenizada cuyos criterios de uso son: > 60 % SeMet y <2 % de selenio inorgánico en cuanto al selenio total, un valor mayor al 2 % de selenio inorgánico podría indicar que la levadura contiene selenio de menor calidad (Bierla *et al.*, 2012). Las formas inorgánicas de selenio son menos efectivas en comparación con las formas orgánicas que tienen una mejor biodisponibilidad y menor toxicidad (Shini *et al.*, 2015).

La principal función del selenio es como antioxidante, mediante la protección contra el estrés oxidativo, al eliminar los radicales libres (Kieliszek, 2019).

Selenio en la inmunidad

El sistema inmunológico se ve afectado por niveles de selenio en la dieta y la expresión de selenoproteínas. En condiciones de deficiencia de selenio, las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas se deterioran (Avery y Hoffmann, 2018).

La deficiencia de selenio disminuye la resistencia a infecciones bacterianas y virales. También, disminuye la función de los neutrófilos, la producción de anticuerpos, la proliferación de linfocitos T y B en respuesta a mitógenos, la citodestrucción por linfocitos T y las células asesinas naturales, asimismo la suplementación con selenio induce alta concentración de IgG en el suero y el calostro (Sordillo, 2013; Hefnawy y Tortora-Perez, 2010).

El selenio es un inmunoestimulador, media la inflamación y la inmunidad, influye en los procesos de proliferación de células T, en la diferenciación de células T auxiliares, interviene en la actividad de las células asesinas naturales (NK) y en otras funciones de células inmunitarias innatas (Huang *et al.*, 2012), modula la respuesta inflamatoria a través de los

niveles de interleucina (IL) -1 β e IL-6 y mejora significativamente la mecánica respiratoria (Mahmoodpoor *et al.*, 2018). Además, la administración dietética de selenio eleva niveles de expresión y traducción de ARNm que codifica para selenoproteínas y genes implicados en inflamación y respuestas de interferón γ (IFN γ) (Tsuji *et al.*, 2015).

El suplemento con selenio incrementa el porcentaje de muerte bacteriana debido a los neutrófilos y aumenta los anticuerpos KLH en ovejas afectadas por pododermatitis (gabarro) (Hall *et al.*, 2013). Concentraciones altas de selenio pueden proteger a los neutrófilos del estrés oxidativo endógeno (Kose y Naziroglu, 2014) y pueden conducir a aumentos significativos en actividad fagocítica de macrófagos, asimismo, mejoran la función del sistema inmunológico durante una fase de salud comprometida (enfermedad) (Salles *et al.*, 2014; Aribi *et al.*, 2015).

Algunos estudios encontraron que el selenio y selenoproteínas pueden regular funciones de migración y fagocitosis en los macrófagos (Carlson *et al.*, 2010). También, el selenio induce cambios fenotípicos en la activación de los macrófagos desde fenotipo proinflamatorio de activación clásica hacia fenotipo antiinflamatorio, activado alternativamente (Nelson *et al.*, 2011).

En la inmunidad adaptativa el consumo de selenio influye en activación de funciones de células T y B. Niveles altos de selenio *in vivo* tiene efecto positivo sobre la proliferación y diferenciación de células T auxiliares (Th) del grupo de diferenciación 4+ (Hoffmann *et al.*, 2010).

Selenio en la reproducción y gestación

El selenio mejora la eficiencia reproductiva, puede incrementar la tasa de parición y fertilidad, así como, las contracciones uterinas. El suplemento con Se puede reducir la incidencia de metritis y quistes ováricos durante el período posparto, aumenta la fertilidad al reducir la muerte embrionaria durante el primer mes de gestación (Mehdi y Dufrasne, 2016). En machos, incrementa el número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida, ayuda a tener mejor motilidad espermática, viabilidad y libido (Muñoz *et al.*, 2009; Ahsan, *et al.*, 2014).

En el sexo masculino, las selenoproteínas GPx1, GPx3, mGPx4, cGPx4 y GPx5, protegen a los espermatozoides contra el daño oxidativo durante todo el proceso de maduración, mientras que las selenoproteínas mGPx4 y snGPx4 sirven como componentes estructurales de espermatozoides maduros. Por tanto, el selenio y las selenoproteínas aseguran la viabilidad de los espermatozoides y proporcionan protección contra las ROS. Tanto la ausencia como la deficiencia de selenoproteínas, además de, niveles altos de selenio durante la espermatogénesis, dan como resultado espermatozoides anormales y también puede afectar la calidad y la fertilidad del semen; por lo que el selenio debe estar en cantidad óptima para mantener la función reproductiva y evitar la infertilidad (Ahsan *et al.*, 2014).

En el sexo femenino, el suplemento con selenio (inorgánico y/u orgánico), puede mejorar el potencial de desarrollo de embriones, ovocitos, la fisiología ovárica (Ceko *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019). Además, el selenio influye en la expresión génica durante la maduración del ovocito de yak (bovino nativo de Asia Central) y beneficia la formación y calidad de blastocistos (Xiong *et al.*, 2018). También puede regular positivamente los sistemas

antioxidantes endógenos y proteger a las células del trofoblasto del estrés oxidativo (Watson, *et al.*, 2012).

El selenio reduce la muerte celular y modula los niveles de ARNm proapoptótico (p53 y Bim) y antiapoptótico (NF-kB y Bcl2) de las células foliculares tiroideas (Nettore *et al.*, 2017). El selenio es importante en la proliferación y esteroidogénesis, al activar las vías PI3K/Akt y AMPK, al aumentar la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y la síntesis de esteroides, y al regular el estrés oxidativo celular (Yao *et al.*, 2018).

El suplemento con selenio a la madre como a la descendencia, es esencial para la salud óptima y la protección a la descendencia contra el estrés oxidativo. La suplementación prenatal con selenio facilita la eficacia del sistema antioxidante en el momento del nacimiento, mientras que la suplementación postnatal con selenio se convierte en el principal determinante del estado de selenio y salud en la progenie después de los primeros días de vida (Pappas *et al.*, 2019).

La suplementación supranutricional de selenio en ovejas gestantes con restricción nutricional promovió un mejor crecimiento fetal, al aumentar la masa fetal, de lo que se puede inferir que el selenio tiene efecto conservador (Meyer *et al.*, 2010; Vonnahme *et al.*, 2010).

El selenio ayuda en la supervivencia y crecimiento de corderos (Muñoz *et al.*, 2009); es decir, promueve mayor rendimiento de corderos por oveja (Stewart *et al.*, 2012) y proporciona mayores tasas de crecimiento al destete (Parraguirre *et al.*, 2015).

Selenio y su acción ante el estrés

Todas las condiciones de estrés estimulan la generación de ROS mediante la disminución del acoplamiento de oxidación y fosforilación en las mitocondrias que resulta en mayor fuga de electrones y sobreproducción de radicales superóxido. Una vez que la producción de ROS excede la capacidad del sistema antioxidante, para neutralizarlos, se desarrolla la peroxidación de lípidos que puede resultar en daño de lípidos insaturados en la membrana y alteración de la integridad celular. El estrés oxidativo se produce debido a la acumulación gradual de daño por los radicales libres que se generan durante el metabolismo normal, y se considera uno de los principales mecanismos subyacentes al envejecimiento del organismo (Salmon *et al.*, 2010).

El aumento de ROS y la acumulación de estrés oxidativo durante el envejecimiento ovárico contribuyen a la atresia folicular y la disminución cuantitativa y cualitativa de ovocitos, tiene impacto negativo en la maduración de ovocitos, la fertilización y el desarrollo embrionario (Lim y Luderer, 2011).

En animales, la exposición materna a condiciones de estrés durante el final de la gestación puede afectar la transferencia transplacentaria activa de IgG o disminuir el contenido de IgG del calostro materno y puede afectar la absorción intestinal en los recién nacidos (Merlot *et al.*, 2008).

La reducción del estrés oxidativo mediante la suplementación de antioxidantes reduce potencialmente el daño inducido por ROS, y así, puede mantener la cantidad y calidad de ovocitos y folículos. La enzima glutatión peroxidasa (GPX) ayuda a controlar la producción excesiva de radicales libres. Otras selenoproteínas como la selenoproteína-S regulan las

citocinas inflamatorias y la selenoproteína-P para así funcionar como inductora de homeostasis. El selenio y selenoproteínas con propiedades antioxidantes pueden mantener el estado redox intracelular y proteger a las células sanas del daño oxidativo inducido por las ROS (Hariharan y Dharmaraj, 2020).

Selenio y la expresión génica

El selenio es un regulador clave al incorporarse a selenoproteínas para actuar a nivel postranscripcional y transcripcional (Labunskyy *et al.*, 2014; Lammi y Qu, 2018).

El selenio tiene el potencial de reducir daño del ADN y aumentar la capacidad de reparación, debido al efecto antioxidante de las selenoproteínas como la GPX, que elimina las ROS antes de causar daño al ADN, protege los ácidos grasos, los glóbulos rojos, la hemoglobina, y componentes celulares como las membranas y el ADN (Kieliszek y Błażej, 2013; Kieliszek *et al.*, 2018).

En algunos estudios en ovejas se ha encontrado que la suplementación supranutricional de levadura con selenio aumenta la expresión de genes de selenoproteína implicados en la inmunidad innata, aumenta la selenoproteína S, la GPX 4 y disminuye las yodotironina desyodinasas 2 y 3, en sangre; también, incrementa los perfiles de la expresión de algunos genes en los neutrófilos asociados con la inmunidad innata como la L-selectina, el receptor de IL-8 y el receptor tipo Toll 4 (Hugejiletu *et al.*, 2013).

En corderos el suplemento con selenio aumenta la expresión de ARNm de apolipoproteína E (*APOE*) y lipoproteína lipasa (*LPL*) en músculo y *LPL* en hígado. Los patrones de expresión de ARNm de varias selenoproteínas dependen en gran medida de los

niveles de selenio en la dieta, y su expresión se rige por principios jerárquicos y mecanismos específicos de tejido (Juszczuk-Kubiak *et al.*, 2016).

La suplementación a corto plazo de altos niveles de “selenio orgánico” a ovejas, puede modular el proceso de transcripción y encender el sistema inmunológico. Asimismo, regula positivamente las siguientes selenoproteínas: proteína de unión a selenio 1 (SELENBP1), selenoproteína W1 (SEPW1), glutatión peroxidasa 3 (GPX3) y septina 8 (SEPT8) (Elgandy *et al.*, 2016).

Selenoproteínas

Las selenoproteínas son proteínas que contienen selenio o proteínas que contienen al menos una selenocisteína (Sec). Las selenoproteínas se encuentran involucradas en diversas vías moleculares y funciones biológicas. Se han identificado más de 50 selenoproteínas, 30 en mamíferos y alrededor de 25 en humanos (Metanis y Hilvert, 2014).

Las selenoproteínas se pueden clasificar en subfamilias de acuerdo a la función celular desempeñada: implicadas en antioxidación (GPX1, GPX2, GPX3, GPX4), regulación redox (TXNRD1, TXNRD2, TXNRD3, MSRB1, SELENOH, SELENOM, SELENOW), metabolismo de la hormona tiroidea (DIO1, DIO2, DIO3), transporte y almacenamiento de selenio (SELENOP), entre otras (Pitts y Hoffmann, 2018). En el Cuadro 1 se presentan algunas de las principales selenoproteínas y sus funciones.

Cuadro 1. Selenoproteínas y sus funciones.

Selenoproteína	Abreviatura (s)	Función
Glutación peroxidasa citosólica	GPX1	Antioxidante, reduce H ₂ O ₂ celular.
Glutación peroxidasa gastrointestinal	GPX2	Reduce peróxidos en el intestino.
Glutación peroxidasa plasmática	GPX3	Antioxidante en plasma, reduce peróxidos en sangre.
Hidroperóxido de fosfolípido glutación peroxidasa	GPX4	Reduce peróxido de fosfolípidos, desintoxicación de hidroperóxidos lipídicos, metabolismo de lípidos.
Tiorredoxina reductasa tipo I	TRXRD1, TR1	Localizada en citoplasma y núcleo; regenera la tiorredoxina reducida.
Tiorredoxina reductasa tipo II	TRXRD2, TR3	Localizada en mitocondrias; regenera la tiorredoxina reducida.
Tiorredoxina reductasa tipo III	TRXRD3, TR2, TGR	Expresión específica de testículos; regenera la tiorredoxina reducida.
Yodotironina desyodinasas tipo I	DIO1	Importante para los niveles sistémicos de hormona tiroidea activa.
Yodotironina desyodinasas tipo II	DIO2	Enzima retículo endoplasmático importante para los niveles de hormona tiroidea activa local, activación de hormonas; desyodación de T ₄ a T ₃
Yodotironina desyodinasas tipo III	DIO3	Inactiva la hormona tiroidea, inactivación de hormonas, conversión de T ₄ en rT ₃
Metionina sulfóxido reductasa B1	MSRB1, SelR	Reduce las metioninas sulfoxidadas en proteínas.
Selenoproteína F	SELENOF	Plegado de proteínas
Selenoproteína H	SELENOH, SelH	Localización nuclear; involucrada en la detección y transcripción redox.

Selenoproteína	Abreviatura (s)	Función
Selenoproteína I	SELENOI, SelI, EPT1	Posiblemente involucrada en la biosíntesis de fosfolípidos.
Selenoproteína K	SELENOK, SelK	Proteína transmembranal localizada en el retículo endoplasmático (RE), involucrada en flujo de calcio en las células inmunes y degradación asociada al RE en líneas celulares.
Selenoproteína M	SELENOM, SelM	Proteína residente del RE similar a la tioredoxina, puede estar involucrada en regulación de peso corporal y metabolismo energético.
Selenoproteína N	SELENON, SelN, SEPN1, SepN	Proteína transmembranal localizada en el RE.
Selenoproteína O	SELENOO, SelO	Proteína mitocondrial que contiene un motivo CXXU sugestivo de función redox.
Selenoproteína P	SELENOP, SelP, Sepp1	Propiedades antioxidantes, mantenimiento de homeostasis del selenio, almacenamiento y transporte de selenio a través del plasma a ciertos tejidos, especialmente en testículos y cerebro.
Selenoproteína S	SELENOS, SelS, SEPS1, SELENOS, VIMP	Proteína transmembrana encontrada en el RE involucrada en la degradación asociada al RE de degradación de proteínas asociada al RE de plegamiento de proteínas.
Selenoproteína T	SELENOT, SelT	Proteína del RE involucrada en la movilización de calcio.
Selenoproteína V	SELENOV, SelV	Expresión testicular específica.
Selenoproteína W	SELENOW, SelW, SEPW1	Función antioxidante putativa, quizás importante en el crecimiento muscular.
Selenofosfato sintetasa	SPS2	Participa en la síntesis de todas las selenoproteínas, incluido el de ella misma.

Tomado de Pitts y Hoffmann (2018) y modificado.

Microarreglos o Microarray

La palabra microarray deriva del griego mikro (pequeño) y del inglés array (distribución ordenada). Un microarreglo consiste de un portaobjetos de vidrio al que se adhieren moléculas de ADN monocatenarias en ubicaciones fijas (puntos), cada punto relacionado con un solo gen. Los microarreglos miden la cantidad de ARNm para cada gen. El valor de la expresión de un gen es una medida de luminiscencia relacionada con el ARNm presente.

Existen variaciones de tecnologías en microarreglos, la más popular es para comparar la abundancia de ARNm en dos muestras diferentes (muestra de interés y testigo), de ambas muestras se extraen el ARN y se marcan con fluorocromos diferentes. El material obtenido de las muestras se pone en contacto con el arreglo (array), hibridando aquellas que se complementen con las sondas. Para medir la abundancia relativa del ARN hibridado, la matriz se excita con un láser. Si el ARN de la muestra es abundante, el punto será rojo, si el ARN del control es abundante, será verde. Si la muestra y el control se unen por igual, el punto será amarillo, mientras que, si ninguna de ellas se une, no emitirá fluorescencia y aparecerá negro (Figura 1). Por tanto, a partir de las intensidades de fluorescencia y los colores de cada punto, se pueden estimar los niveles de expresión relativa de los genes en la muestra y el testigo (Brazma y Vilo, 2000).

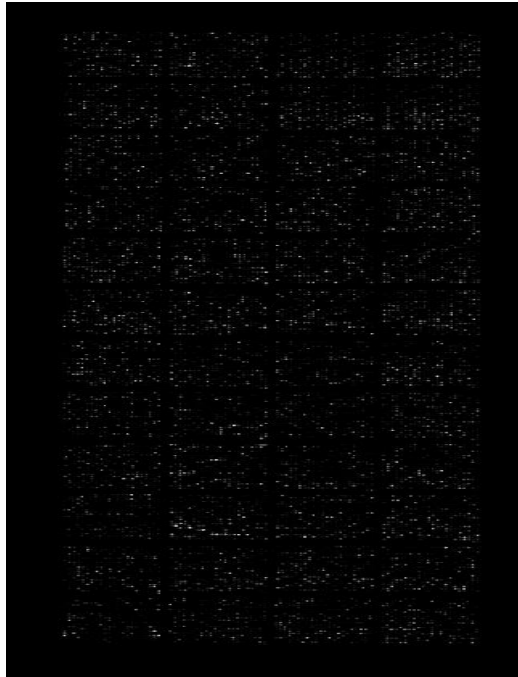


Figura 1. Imagen de la muestra del escaneo del microarreglo de ratón que contiene más de 20000 genes, utilizado para determinación del nivel de expresión génica de folículos *in vitro* expuestos a “selenio orgánico”.

En general, los estudios de microarreglos combinan técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. Existen diversos tipos de microarreglos los más comunes son: microarreglos de cDNA, microarreglos de oligonucleótidos, microarreglos de proteínas y microarreglos de tejidos. Los microarreglos generan grandes cantidades de perfiles de expresión génica y podrían utilizarse para diagnosticar enfermedades (Zeebaree *et al.*, 2018).

Los microarreglos son reproducibles y aportan gran cantidad de información sobre la regulación de expresión génica en condiciones normales y patológicas o de interés, como cáncer (Guan *et al.*, 2019) y otros trastornos en la salud (Leday *et al.*, 2018). Los

microarreglos deben validarse con posterioridad mediante técnicas de PCR cuantitativa, ya que en su lectura existen problemas de estandarización y otras fuentes de variabilidad como: dilución de las muestras biológicas, sensibilidad indeterminada a factores y procedimientos mal estandarizados y controlados (temperatura y volúmenes de disoluciones), diversidad de procedimientos de procesamiento de datos, sistemas inapropiados de análisis de datos, análisis de imágenes, detección de puntos, corrección de fondo, normalización y diversas técnicas de control de calidad, entre otros (Koschmieder *et al.*, 2011). Los microarreglos siguen siendo la elección más común de los investigadores cuando realizan experimentos de perfiles transcripcionales, debido a que es más barato que RNA-Seq, asimismo se ha demostrado alta correlación entre los perfiles de expresión génica generados por las dos tecnologías de secuenciación de RNA-Seq y microarrays Affymetrix (Zhao *et al.*, 2014).

El éxito de un ensayo de microarreglos depende en gran parte de la calidad de la muestra biológica obtenida. El RNA total debe estar intacto y puro, no debe contener proteínas ni DNA contaminante. Para ello se exige que sea evaluado en cantidad y calidad con espectrofotometría, mientras que la integridad es evaluada por electroforesis. El diseño experimental es esencial en los experimentos de microarreglos, crucial desde la recolección de muestras y criterios de inclusión. También, es indispensable realizar duplicaciones biológicas y técnicas del experimento. Un duplicado biológico es aquel donde se obtiene RNA en dos eventos diferentes o RNA de individuos diferentes que se integran en el análisis. Los duplicados técnicos son las hibridaciones de un mismo RNA en diferentes microarreglos para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos (Barrero, 2005).

Literatura citada

- Abumaree, M.H., Chamley, L.W., Badri, M., El-Muzaini, M.F. 2012. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft? *J. Reprod. Immunol* 94(2): 131-141.
- Abu-Raya, B., Michalski, C., Sadarangani, M., Lavoie, P.M. 2020. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Front. Immunol.* 11: 575197. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575197>.
- Actor, J.K. 2012. Innate immunity. Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology. 43–51. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-07447-6.00006-5>.
- Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M.H., Iqbal, Z. 2014. Role of selenium in male reproduction: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 146: 55-62.
- Ander, S. E., Diamond, M. S., & Coyne, C. B. 2019. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci. Immunol.* 4(31): eaat6114. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114>.
- Arias, M.E., Villegas, J. 2010. Avances en inmunidad gestacional. *Int. J. Morphol.* 28(3): 713-718.
- Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., Aymeric, J.L. 2015. Macrophage bactericidal activities against *Staphylococcus aureus* are enhanced in vivo by selenium supplementation in a dose-dependent manner. *PLoS. ONE.* 10(9): e0135515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>.
- Arnaudguilhem, C., Bierla, K., Ouerdane, L., Preud'homme, H., Yiannikouris, A., Lobinski, R. 2012. Selenium metabolomics in yeast using complementary reversed-phase/hydrophilic ion interaction (HILIC) liquid chromatography–electrospray hybrid quadrupole trap/Orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 757: 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.029>.
- Avery, J.C., Hoffmann, P.R. 2018. Selenium, selenoproteins, and immunity. *Nutrients.* 10(9): 1203. <https://doi.org/10.3390/nu10091203>.
- Baraño, R.I. 2011. Inmunología del embarazo. *Invest. Clin.* 52(2): 175-194.
- Barrero, P.R. 2005. Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro. *Química Viva.* 4(3): 91-100.
- Bierla, K., Szpunar, J., Yiannikouris, A., Lobinski, R. 2012. Comprehensive speciation of selenium in selenium-rich yeast. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 41: 122-132.
- Biron, C.A. 2016. Innate immunity. Recognizing and Responding to Foreign Invaders-No Training Needed. Chapter 4 (Third edition). *Viral Pathogenesis.* 41-55. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800964-2.00004-5>.
- Brazma, A., Vilo, J. 2000. Gene expression data analysis. *FEBS Lett.* 480(1): 17-24.

- Bulmer, J.N., Williams, P.J., Lash, G.E. 2010. Immune cells in the placental bed. *Int. J. Dev. Biol* 54(2-3): 281-294.
- Burrell, C.J., Howard, C. R., Murphy, F.A. 2017. Innate immunity. Chapter 5 (Fifth edition). *Fenner and white's medical virology*. 57-64. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375156-0.00005-9>.
- Carlson, B.A., Yoo, M.H., Shrimali, R.K., Irons, R., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., Park, J.M. 2010. Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function. *Proc. Nutr. Soc.* 69(3): 300-310. <https://doi.org/10.1017/S002966511000176X>.
- Ceko, M.J., Hummitzsch, K., Hatzirodos, N., Bonner, W.M., Aitken, J.B., Russell, D.L., Lane, M., Rodgers, R.J., Harris, H.H. 2015. X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function. *Metallomics*. 7(1): 71-82.
- Čerkienė, Z., Eidukaitė, A., Usonienė, A. 2010. Immune factors in human embryo culture and their significance. Institute of Immunology. *Medicina (Kaunas)*. 46(4): 233-239.
- Ciraci, C., Janczy, J.R., Sutterwala, F.S., Cassel, S.L. 2012. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. *Micro. Infect.* 14(14): 1263-70.
- Cox, M.A., Kahan, S.M., Zajac, A.J. 2013. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology*. 435(1): 157-69. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.012>.
- Delves, P.J., Martin, S. J., Burton, D.R., Roitt, I.M. 2017. *Roitt's essential immunology*. 13th edition. Wiley-Blackwell. 578.
- Díaz, M.D., Prieto, M.A., Úbeda, C.M., Álvarez-Mon, S.M. 2013. Linfocitos T. *Med (Spain)*. 11(28): 1699-1709.
- Elgendy, R., Giantin, M., Castellani, F., Grotta, L., Palazzo, F., Dacasto, M., Martino, G. 2016. Transcriptomic signature of high dietary organic selenium supplementation in sheep: A nutrigenomic insight using a custom microarray platform and gene set enrichment analysis. *J. Anim. Sci.* 94(8): 3169-3184.
- Elh mouzi-Younes, J., Boysen, P., Pende, D., Storset, A.K., Le Vern, Y., Laurent, F., Drouet, F., 2010. Ovine CD16+/CD14- blood lymphocytes present all the major characteristics of natural killer cells. *Vet. Res.* 41(1): 4. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009052>.
- Erlebacher, A. 2010. Immune surveillance of the maternal/fetal interface: controversies and implications. *Tren. Endo. Met.* 21(7): 428-434.
- Faas, M.M., de Vos P. 2017. Maternal monocytes in pregnancy and preeclampsia in humans and in rats. *J. Reprod. Immunol.* 119: 91-7. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.06.009>.
- Giaglis, S., Stoikou, M., Sur Chowdhury, C., Schaefer, G., Grimolizzi, F., Rossi, S. W., Hoesli, I. M., Lapaire, O., Hasler, P., Hahn, S. 2016. Multimodal regulation of NET formation in pregnancy: progesterone antagonizes the Pro-NETotic effect of estrogen and G-CSF. *Front. Immunol.* 7: 565. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00565>.

- Grozdzics, E., Berta, L., Bajnok, A., Veres, G., Ilisz, I., Klivényi, P., Rigó, J., Jr, Vécsei, L., Tulassay, T., Toldi, G. 2014. B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth*. 14: 306. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-306>.
- Guan, Y.j., Ma, Jy., Song, W. 2019. Identification of circRNA–miRNA–mRNA regulatory network in gastric cancer by analysis of microarray data. *Cancer. Cell. Int.* 19: 183. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0905-z>.
- Hall, J.A., Vorachek, W.R., Stewart, W.C., Gorman, M.E., Mosher, W.D., Pirelli, G.J., Bobe, G. 2013. Selenium supplementation restores innate and humoral immune responses in footrot-affected sheep. *PLoS. ONE*. 8(12): e82572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082572>.
- Hariharan, S., Dharmaraj, S. 2020. Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacol.* 28(3): 667-695.
- Hefnawy, A.E., Tortora-Perez, J.L. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Res.* 89(2): 185-192.
- Hoffmann, F.W., Hashimoto, A.C., Shafer, L.A., Dow, S., Berry, M.J., Hoffmann, P.R. 2010. Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *J. Nutr.* 140(6): 1155-1161.
- Hofmann, A.P., Gerber, S.A., Croy, B.A. 2014. Uterine natural killer cells pace early development of mouse decidua basalis. *Mol. Hum. Reprod.* 20(1): 66-76.
- Huang, Z., Rose, A.H., Hoffmann, P.R. 2012. The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antiox. Redox. Sig.* 16(7): 705-743. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4145>.
- Hugejiletu, H., Bobe, G., Vorachek, W.R., Gorman, M.E., Mosher, W.D., Pirelli, G.J., Hall, J.A. 2013. Selenium supplementation alters gene expression profiles associated with innate immunity in whole-blood neutrophils of sheep. *Biol. Trace. Elem. Res.* 154(1): 28-44.
- Juszczuk-Kubiak E, Bujko K, Cymer M, Wicińska K, Gabryszuk M, Pierzchała M. 2016. Effect of inorganic dietary selenium supplementation on selenoprotein and lipid metabolism gene expression patterns in liver and loin muscle of growing lambs. *Biol. Trace. Elem. Res.* 172(2): 336-345.
- Kieliszek, M. 2019. Selenium–fascinating microelement, properties and sources in food. *Molecules.* 24(7): 1298. <https://doi.org/10.3390/molecules24071298>.
- Kieliszek, M., Błażej, S. 2013. Selenium: significance, and outlook for supplementation. *Nutrition.* 29(5): 713-718. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.11.012>.

- Kieliszek, M., Błażej, S., Piwowarek, K., Brzezicka, K. 2018. Equilibrium modeling of selenium binding from aqueous solutions by *Candida utilis* ATCC 9950 yeasts. *Biotech.* 8(9): 388. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1415-8>.
- Koldehoff, M., Cierna, B., Steckel, N.K., Beelen, D.W., & Elmaagacli, A.H. 2013. Maternal molecular features and gene profiling of monocytes during first trimester pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 99(1-2): 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.07.001>.
- Koschmieder, A., Zimmermann, K., Trißl, S., Stoltmann, T., Leser, U. 2011. Tools for managing and analyzing microarray data. *Brief. Bioinform.* 13(1): 46-60.
- Kose, S.A., Naziroglu, M. 2014. Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Biol. Trace. Elem. Res.* 158(2): 136-142. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9929-3>.
- Kwan, M., Hazan, A., Zhang, J., Jones, R. L., Harris, L. K., Whittle, W., Keating, S., Dunk, C. E., Lye, S.J. 2014. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation. *Placenta.* 35(12): 1027-1034. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.09.018>.
- Labunskyy, V.M., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. 2014. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* 94(3): 739-777. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2013>.
- Lammi, M.J., Qu, C. 2018. Selenium-related transcriptional regulation of gene expression. *Int. J. Mol. Sci.* 19(9): 2665. <https://doi.org/10.3390/ijms19092665>.
- Lampé, R., Kövér, Á., Szűcs, S., Pál, L., Árnay, E., Ádány, R., Poka, R. 2015. Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 107: 26-30. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.11.001>.
- Leday, G.G.R., Vértes, P. E., Richardson, S., Greene, J. R., Regan, T., Khan, S., Henderson, R., Freeman, T. C., Pariante, C. M., Harrison, N. A., MRC Immunopsychiatry Consortium, Perry, V. H., Drevets, W. C., Wittenberg, G. M., & Bullmore, E. T. 2018. Replicable and coupled changes in innate and adaptive immune gene expression in two case-control studies of blood microarrays in major depressive disorder. *Biol. psychiatry.* 83(1): 70-80.
- Lee, H. R., Kim, B. J., Shin, S., Jeon, H. W., Roh, E. Y., Yoon, J. H., Song, E. Y. 2014. Maternal circulating dendritic cell subtypes at delivery and during the 1-year postpartum period. *Am. J. Reprod. Immunol.* 71(3): 210-216. <https://doi.org/10.1111/aji.12188>.
- Lim, J., Luderer, U. 2011. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol. Reprod.* 84(4): 775-782.
- Liu, J., Liu, M., Ye, X., Liu, K., Huang, J., Wang, L., Ji, G., Liu, N., Tang, X., Baltz, J.M. 2012. Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC). *Hum. Reprod.* 27(5): 1411-1420. <https://doi.org/10.1093/humrep/des019>.

- Liu, S., Diao, L., Huang, C., Li, Y., Zeng, Y., Kwak-Kim, J.Y.H. 2017. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *J. Reprod. Immunol* 124: 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.10.045>.
- Mahmoodpoor, A., Hamishehkar, H., Shadvar, K., Ostadi, Z., Sanaie, S., Saghaleini, S.H., Nader, N.D. 2018. The effect of intravenous selenium on oxidative stress in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome. *Immunol. Invest.* 48(2):147-159. <https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1496098>.
- Manaster, I., Mandelboim, O. 2010. The unique properties of uterine NK cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63(6): 434-444. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00794.x>.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11(8): 519-531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>.
- Martínez, O.A.A., Villaseñor, N.E., Kuribreña, J.C.A., Vega, E.S. 2011. Modulación de la respuesta inmunológica durante el Embarazo. *Rev. Cubana. Obst. Ginecol.* 37(2): 277-287.
- McDonald, R.D., Levy, O. 2019. Innate immunity. *Clinical Immunology*. 5th edition. Elsevier. 39-53 e1.
- Mehdi, Y., Dufrasne, I. 2016. Selenium in cattle: a review. *Molecules.* 21(4): 545. <https://doi.org/10.3390/molecules21040545>.
- Merlo, L. M. F., Mandik-Nayak, L. 2013. Adaptive immunity: B cells and antibodies. *Cancer Immunotherapy*. Chapter 3 (Second edition). 25-40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394296-8.00003-8>.
- Merlot, E., Couret, D., Otten, W. 2008. Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain. Behav and Imm*, 22(1): 42-51.
- Metanis, N., Hilvert, D. 2014. Natural and synthetic selenoproteins. *Curr Opin Chem Biol.* 22: 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.010>.
- Meyer, A.M., Reed, J.J., Neville, T.L., Taylor, J.B., Hammer, C.J., Reynolds, L.P., Vonnahme, K.A., Caton, J.S. 2010. Effects of plane of nutrition and selenium supply during gestation on ewe and neonatal offspring performance, body composition, and serum selenium. *J. Anim. Sci.* 88(5): 1786-1800.
- Mócsai, A. 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 210(7): 1283-1299.
- Moticka, E. J. 2016. Hallmarks of the adaptive immune responses. *A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology*. Chapter 2. 9-19. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-398381-7.00002-2>.
- Muñoz, C., Carson, A.F., McCoy, M.A., Dawson, L.E., Irwin, D., Gordon, A.W., Kilpatrick, D.J. 2009. Effect of supplementation with barium selenate on the fertility, prolificacy

- and lambing performance of hill sheep. *Vet. Record.* 164(9): 265-271. <https://doi.org/10.1136/vr.164.9.265>.
- Muzzio, D., Zenclussen, A.C., Jensen, F. 2013. The Role of B Cells in pregnancy: the good and the bad. *Am. J. Reprod. Immunol.* 69(4): 408-412. <https://doi.org/10.1111/aji.12079>.
- Nancy, P., Erlebacher, A. 2014. T cell behavior at the maternal-fetal interface. *Int. J. Dev. Biol.* 58(2-4):189-198. <https://doi.org/10.1387/ijdb.140054ae>.
- Nelson, S.M., Lei, X., Prabhu, K.S. 2011. Selenium levels affect the IL-4-induced expression of alternative activation markers in murine macrophages. *J. Nutr.* 141(9): 1754-1761. <https://doi.org/10.3945/jn.111.141176>.
- Nettore, I.C., De Nisco, E., Desiderio, S., Passaro, C., Maione, L., Negri, M., Albano, L., Pivonello, R., Pivonello, C., Portella, G., Ungaro, P., Colao, A., Macchia, P.E. 2017. Selenium supplementation modulates apoptotic processes in thyroid follicular cells. *Biofactors.* 243(3): 415-423.
- Pappas, A.C., Zoidis, E., Chadio, S.E. 2019. Maternal selenium and developmental programming. *Antioxidants (Basel).* 8(5): 145. <https://doi.org/10.3390/antiox8050145>.
- Parraguirre, E.A., Miranda, J.L. y Herrera, H.J. 2015. Complemento con selenometionina a ovejas gestantes y efecto el desarrollo de sus corderos. *Agroproduc.* 8(6): 52-58.
- Pitts, M.W., Hoffmann, P.R. 2018. Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell. Calcium* 70: 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.001>.
- Prieto M.A., Barbarroja E.J., Barcenilla R.H. Díaz M.D. 2013. Funciones de los linfocitos B. *Med.* 11(28): 1752-1759.
- Ramírez, L. 2006. Los leucocitos en mamíferos domésticos. *Mundo. Pec,* 2(2): 37-39.
- Robertson, S., Petroff, M., Hunt, J. 2015. Immunology of pregnancy. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* Chapter 41 (Fourth edition). 1835-1874. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00041-7>.
- Salles, M.S.V., Zanetti, M.A., Junior, L.C.R., Salles, F.A., Azzolini, A.E.C.S., Soares, E.M., Faccioli, L.H., Valim, Y.M.L. 2014. Performance and immune response of suckling calves fed organic selenium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 188: 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.11.008>.
- Salmon, A.B., Richardson, A., Pérez, V.I. 2010. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free. Radic. Biol. Med.* 48(5): 642-55.
- Sánchez, S.M., Pino, B.D., Díaz, D.G., Macías A.C., del Valle, P. L. 2016. Comportamiento de las células asesinas naturales, las dendríticas y los macrófagos, en el embarazo. *Rev. Cubana. Hematol. Inmunol. Hemoter.* 32(1): 15-29.

- Shini, S., Sultan, A., Bryden, W.L. 2015. Selenium biochemistry and bioavailability: Implications for animal agriculture. *Agriculture*. 5(4): 1277-1288. <https://doi.org/10.3390/agriculture5041277>.
- Snyder, P.W. 2017. Diseases of Immunity. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Chapter 5. 242-285.e5. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35775-3.00005-9>.
- Sordillo, L.M. 2013. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. *Vet. Med. Int.* 2013(4): 154045. <https://doi.org/10.1155/2013/154045>.
- Stewart, W.C., Bobe, G., Pirelli, G.J., Mosher, W.D. and Hall, J.A. 2012. Organic and inorganic selenium: III. Ewe and progeny performance. *J. Ani. Sci.* 90(12): 4536-4543.
- Svensson-Arvelund, J., Mehta, R. B., Lindau, R., Mirrasekhian, E., Rodriguez-Martinez, H., Berg, G., Lash, G. E., Jenmalm, M. C., Ernerudh, J. 2015. The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. *J. Immunol.* 194(4): 1534-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401536>.
- Tang, M.X., Hu, X.H., Liu, Z.Z., Kwak-Kim, J., Liao, A. H. 2015. What are the roles of macrophages and monocytes in human pregnancy? *J. Reprod. Immunol.* 112: 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.08.001>.
- Toche, P.P. 2012. Visión panorámica del sistema inmune panoramic vision of the immune system. *Rev. Méd. Clín Condes.* 23(4): 446-457.
- Tsuji, P.A., Carlson, B.A., Anderson, C.B., Seifried, H.E., Hatfield, D.L., Howard, M.T. 2015. Dietary selenium levels affect selenoprotein expression and support the interferon-gamma and IL-6 immune response pathways in mice. *Nut.* 7(8): 6529-6549.
- Vacca, P., Cantoni, C., Vitale, M., Prato, C., Canegallo, F., Fenoglio, D., Ragni, N., Moretta, L., Mingari, M.C. 2010. Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(26): 11918-11923.
- Vázquez-Rodríguez, S., Bouchan-Valencia, P., González-Jiménez, M.A., Paredes-Vivas, L.Y., Calixto-González, R., Cébulo-Vázquez, A. 2011. Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Perin. Reprod. Hum.* 25(1): 39-45.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W.M. Ugolini, S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 331(6013): 44-49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>.
- Vonnahme, K.A., Luther, J.S., Reynolds, L.P., Hammer, C.J., Carlson, D.B., Redmer, D.A., Caton, J.S. 2010. Impacts of maternal selenium and nutritional level on growth, adiposity, and glucose tolerance in female offspring in sheep. *Domest. Anim. Endocrinol.* 39(4): 240-248.

- Watson, M., Van Leer, L., Vanderlelie, J., Perkins, A. 2012. Selenium supplementation protects trophoblast cells from oxidative stress. *Placenta*. 33(12): 1012-1019. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.09.014>.
- Wherry, E.J., Masopust, D. 2016. Adaptive immunity: neutralizing, eliminating, and remembering for the next time. *Viral Pathogenesis*. Chapter 5 (Third edition). 57-69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800964-2.00005-7>.
- Xing, L, Qi Z. 2010. Pregnancy estrogen drives the changes of Tlymphocyte subsets and cytokines and prolongs the survival of H – Y skin graft in muirine model. *Chin. Med. J.* 123(18): 2593-2599.
- Xiong, X., Lan, D., Li, J., Lin, Y., Li, M. 2018. Selenium supplementation during *in vitro* maturation enhances meiosis and developmental capacity of yak oocytes. *Anim. Sci J.* 89(2): 298-306.
- Yang, H., Qazi, I. H., Pan, B., Angel, C., Guo, S., Yang, J., Zhang, Y., Ming, Z., Zeng, C., Meng, Q., Han, H., Zhou, G. 2019. Dietary selenium supplementation ameliorates female reproductive efficiency in aging mice. *Antioxidants (Basel)*. 8(12): 634. <https://doi.org/10.3390/antiox8120634>.
- Yao, X., EI-Samahy, M.A., Fan, L., Zheng, L., Jin, Y., Pang, J., Zhang, G., Liu, Z., Wang, F. 2018. *In vitro* influence of selenium on the proliferation of and steroidogenesis in goat luteinized granulosa cells. *Theriogenol.* 114: 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.03.014>.
- Zeebaree, D.Q., Haron, H., & Abdulazeez, A.M. 2018. Gene selection and classification of microarray data using convolutional neural network. 2018 International Conference on Advanced Science and Engineering (ICOASE). 145-150. <https://doi.org/10.1109/icoase.2018.8548836>.
- Zhao, S., Fung-Leung, W.P., Bittner, A., Ngo, K., Liu, X. 2014. Comparación de RNA-Seq y Microarray en el perfil de transcriptomas de células T activadas. *PLoS. ONE*. 9(1): e78644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078644>.

CAPÍTULO I. LEUCOCITOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVEJAS COMO RESPUESTA A “SELENIO ORGÁNICO”¹

1.1 RESUMEN

El selenio contrarresta el daño celular causado por estrés oxidativo y mejora la respuesta fisiológica del organismo. En este estudio se evaluaron leucocitos durante el desarrollo embrionario de ovejas como respuesta al “selenio orgánico”. Veintisiete ovejas locales del municipio de San Andrés Chiautla, Estado de México, con edad promedio de 2.5 años, se asignaron al azar en dos grupos, 11 en grupo testigo (sin selenio; S-Se) y 16 con adición de levadura enriquecida con selenio (“selenio orgánico”; C-Se) a dosis de 0.3 mg, vía oral por período de siete días antes de la inseminación artificial (IA) con dieta a base de alfalfa achicalada y rastrojo de maíz. Se realizó conteo diferencial de células sanguíneas blancas; en frotis sanguíneos realizados antes, durante y después del tratamiento de selenio. Los datos se analizaron mediante modelo mixto, mostrando diferencias significativas por tratamiento y tiempo ($P \leq 0.05$) en neutrófilos; el día 9 del desarrollo embrionario (5.91 ± 0.89 y 2.11 ± 0.46 ; S-Se y C-Se, respectivamente) y basófilos el día -3 (1.85 ± 0.31 y 1.05 ± 0.23). En cuanto a los linfocitos y eosinófilos mostraron diferencia por tiempo ($P \leq 0.05$) pero no por tratamiento ($P \geq 0.05$). Se concluye que el selenio disminuye el número de neutrófilos y basófilos; después de formarse el blastocisto y cuatro días después de iniciado el tratamiento con selenio.

Palabras clave: leucocitos, “selenio orgánico”, ovejas.

¹Artículo publicado en la revista Abanico Veterinario. 2019. 9; e94.
<https://doi.org/10.21929/abavet2019.94>.

1.2 ABSTRACT

The selenium decreases cellular damage caused by oxidative stress and improves the physiological response. Leukocytes were evaluated during embryonic development in ewes with consumption of “organic selenium”. A total of 27 local ewes at the municipality of San Andrés Chiautla, Mexico State, with an average age of 2.5 years, were randomly assigned in two groups, 11 in control group (without selenium, S-Se) and 16 with oral selenium (C-Se; selenium-enriched yeast) added at 0.3 mg dose, for a period of seven days before Artificial Insemination (IA). The diet was based on alfalfa and corn stubble. White cell differential counting was performed on blood smears. Blood samples were taken before, during and after selenium treatment. Data were analyzed by mixed model, showing significant differences by treatment and time ($P \leq 0.05$) in neutrophils; day 9 of embryonic development (5.91 ± 0.89 y 2.11 ± 0.46 ; S-Se y C-Se, respectively) and basophils amount was at day -3 (1.85 ± 0.31 y 1.05 ± 0.23). Regarding lymphocytes and eosinophils, they showed a difference in time ($P \leq 0.05$) but not by treatment ($P \geq 0.05$). It is concluded that selenium decreases the number of neutrophils and basophils; after blastocyst formation and four days after starting organic selenium treatment.

Keywords: leukocytes, organic selenium, ewes.

1.3 INTRODUCCIÓN

El selenio es un micronutriente esencial para el funcionamiento adecuado del organismo, la deficiencia en este mineral produce pérdida en la homeostasis del mineral que puede resultar en patologías (Huang *et al.*, 2012; Ahsan *et al.*, 2014). Los niveles de selenio regulan procesos de inflamación e inmunidad (Huang *et al.*, 2012). Existen dos tipos de respuesta ante la invasión de agentes extraños al organismo: La respuesta inmune innata (natural); es

una respuesta rápida, no específica, compuesta de barreras mecánicas, mucosas y células productoras de citocinas y quimiocinas. La inmunidad innata actúa organizada hasta la activación de la inmunidad adaptativa. La inmunidad adquirida (adaptativa) es de respuesta rápida, con memoria inmunológica, mediada por células T y B, las cuales para su activación requieren de la presentación y procesamiento de antígenos. La inmunidad adaptativa se divide en dos áreas, la inmunidad humoral; mediada por linfocitos B y la inmunidad celular; mediada por los linfocitos T. Las respuestas innatas y adquiridas generalmente funcionan juntas para eliminar patógenos. Las células de respuesta innata utilizan células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células que liberan mediadores inflamatorios (basófilos, mastocitos y eosinófilos) y células asesinas naturales (Delves y Roitt, 2000).

De acuerdo a Martínez *et al.* (2011), durante la gestación normal; en la mucosa uterina se encuentra gran número de leucocitos (neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales y células dendríticas), células que cumplen múltiples funciones como: fagocitosis, producción de citocinas, producción de metabolitos del oxígeno (óxido nítrico (ON), anión superóxido), liberación de prostaglandinas, proteínas de fase aguda y péptidos antimicrobianos.

Investigaciones hechas en los últimos años involucran aspectos del sistema inmune (en selección, maduración y activación de algunos eventos de células inmunes), estos estudios muestran variaciones en las concentraciones de leucocitos según los eventos fisiológicos de enfoque, como son: gestación, lactancia, edad, raza, efecto del estrés e incluso la ubicación geográfica de la explotación animal; así como la condición de salud (Hoffmann y Berry, 2008).

La cantidad de nutrientes transferidos a la descendencia depende del estado nutricional de la madre y la eficiencia del mecanismo de transporte transplacentario y mamario; el paso de

oligoelementos y otros nutrientes a través de la placenta es necesario para: el desarrollo embrionario, crecimiento fetal y funciones fisiológicas de la madre y el feto durante la gestación. El selenio pasa eficientemente a través de la barrera placentaria hacia tejidos fetales y también se transfiere al calostro y la leche (Rock *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2012; Erdogan *et al.*, 2017). La deficiencia nutricional de selenio causa: problemas de fertilidad, aborto, retención placentaria, enfermedad del músculo blanco, debilidad neonatal (Spears, 2011), mortalidad, crecimiento, desarrollo e implantación del embrión inadecuada (Sharma y Agarwal, 2004) y baja inmunidad (Rayman, 2012). Dichos problemas se pueden prevenir adicionando selenio a la dieta de los animales.

Existen diversa formas y fuentes de selenio; orgánicas (selenometionina, selenocisteína) e inorgánicas (selenito y selenato de sodio). El orgánico tiene mayor biodisponibilidad, es tres veces menos tóxico que el inorgánico; es citoprotector, debido a que se incorpora a los tejidos de reserva (Yue *et al.*, 2009; Lyons *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de que se mencionan diversos beneficios del selenio en la inmunidad celular, no existe información precisa sobre el efecto del mineral en la presencia de células del paquete celular blanco; encargadas de la respuesta inmune en ovejas durante la gestación. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar la respuesta de leucocitos durante el desarrollo embrionario de ovejas con aplicación oral de “selenio orgánico” otorgado antes de ser inseminadas.

1.4 MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el municipio de San Andrés Chiautla, Estado de México; con coordenadas geográficas 19°36'19" N y 98°54'38" O, y altitud de 2260 msnm. El clima es templado-semiseco, registrando temperatura media anual de 19°C, con máxima de 32°C

y mínima de 6°C (Inafed, 2018). Se utilizaron 27 ovejas locales (raza indefinida) multíparas con peso entre 35 y 38.2 kg, condición corporal de 2.5 (escala de 1 a 5) y edad promedio de 2.5 años. Las ovejas se asignaron al azar en dos grupos, 11 para el grupo testigo (sin selenio; S-Se) y 16 con adición de levadura enriquecida con selenio (“selenio orgánico”; C-Se) a dosis de 0.3 mg; requerimiento de acuerdo al NRC, considerando que el lugar donde se realizó el experimento es deficiente en selenio (Targetmap, 2013). Durante todo el experimento las ovejas se mantuvieron en estabulación permanente y se alimentaron con dieta a base de alfalfa achicalada y rastrojo de maíz.

La administración oral de “selenio orgánico” (C-Se), fue por periodo de siete días antes de la IA, y al grupo S-Se se les administró placebos. Antes del inicio del tratamiento se desparasitaron (Ivermetina dosis: 1ml) y se aplicó vitamina (Complejo B); se sometieron a protocolo de sincronización de estro con esponjas intravaginales Cronolone (Chronogest® CR), impregnadas con 20 mg de progestágeno durante 14 días. Al retirar las esponjas, se aplicaron 400 UI de eCG (Folligon®) y la IA se realizó 55 horas después del retiro de esponjas, por el método de endoscopía.

Se tomaron muestras sanguíneas para realizar frotis. Antes del tratamiento con “selenio orgánico”; antes de desparasitar a las ovejas (39 días antes de la IA), un día antes de iniciar el tratamiento con selenio (día -8), durante los días -5, -3 y -1 [día cero considerado como el día de la IA] y después de la IA; los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 19, 23, 28 y 42; este último periodo de muestreo se consideró como periodo de desarrollo embrionario en la oveja.

La técnica para frotis sanguíneo que se realizó es la que se utiliza en el módulo de reproducción del Colegio de Postgraduados. Los frotis sanguíneos se realizaron colocando

tres gotas de sangre provenientes de cada oveja en el centro de un portaobjetos y se hizo el barrido de la muestra de forma uniforme para formar una capa delgada de tejido sanguíneo; se secó a temperatura ambiente por tiempo aproximado de 10 minutos, después de este tiempo se aplicó etanol al 96% para fijar la muestra, se tiñeron con Hematoxilina Gill No.3 (Sigma-Aldrich) por 5 minutos y se realizó un lavado con agua destilada. El conteo diferencial de leucocitos se realizó con microscopio óptico a 40x de resolución, en cinco repeticiones (campos microscópicos) por muestra.

Diagnóstico de gestación se realizó 35 días posteriores a la IA, con ecógrafo portátil marca Draminski modelo 4Vet mini, con transductor abdominal 7.5 MHz; la exploración de estructuras propias de gestación se hizo a nivel de la fosa iliaca. Para el diagnóstico las ovejas estuvieron en ayuno de 12 horas antes de realizar la ecografía.

Las variables dependientes que se evaluaron fueron: cantidad diferencial de glóbulos blancos; linfocitos, neutrófilos, monocitos, basófilos y eosinófilos. Las ovejas se distribuyeron de manera aleatoria para cada tratamiento; incluyendo a la oveja como efecto aleatorio. Se utilizó un modelo mixto mediante el procedimiento MIXED (SAS, 2002), con el siguiente modelo: $Y_{ijk} = \mu + T_i + \text{Tiempo}_j + T_i * \text{Tiempo}_{ij} + \varepsilon_{ijk}$; en donde: Y_{ij} : variable dependiente analizada, μ : media general de la población, T_i : i-ésimo tratamiento, P_j : j-ésimo tiempo, $T_i * \text{Tiempo}_{ij}$: interacción entre el tratamiento y el tiempo de muestreo, ε_{ijk} : error aleatorio. En los casos de significancia estadística ($P \leq 0.05$), las medias se compararon con la prueba de Tukey.

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio la adición de “selenio orgánico” a ovejas no mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en linfocitos (figura 1a); mientras que se presentó efecto significativo por tratamiento ($P \leq 0.05$) en neutrófilos el día 9 del desarrollo embrionario [5.91 ± 0.89 S-Se y 2.11 ± 0.46 C-Se, respectivamente (figura 1b)]. No se encontró diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en linfocitos entre tratamiento; en contraste con los resultados encontrados por Broome *et al.*, (2004), quienes al adicionar selenio observaron aumento en cantidad de linfocitos. El día -8 que corresponde un día antes del inicio del tratamiento y el día -5 durante el tratamiento; muestran el menor número de células sanguíneas blancas en el tiempo. El día uno corresponde un día después de la inseminación, y en el día tres se da la fecundación del óvulo; observando así disminución de linfocitos y neutrófilos en ambos eventos fisiológicos. Considerando que los neutrófilos son células fagocíticas (junto con monocitos y macrófagos), se enlazaría con la posibilidad de menor rechazo de espermatozoides.

Los linfocitos T son considerados moduladores de la respuesta inmunológica de la madre, ya que regulan el proceso de implantación durante el primer trimestre de embarazo, existiendo incremento de células T (Martínez *et al.*, 2011). Resultados que coinciden con los de este estudio, al incrementar la cantidad de linfocitos a partir del día 11 del desarrollo embrionario, donde días después empieza la implantación (figura 1a). En abortos espontáneos se ha observado disminución en el número de las células T reguladoras (Guerin *et al.*, 2009).

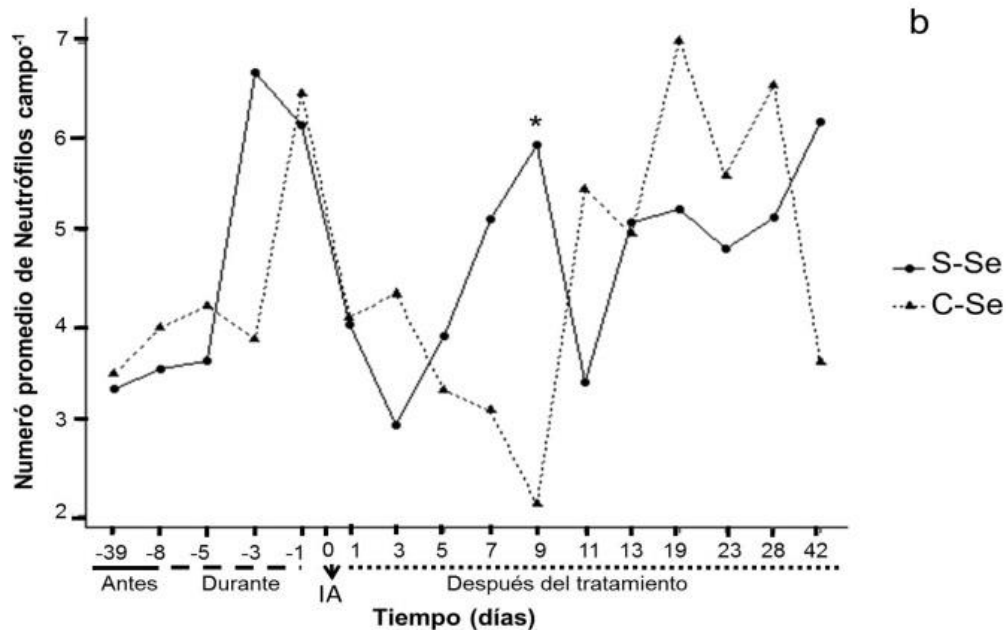
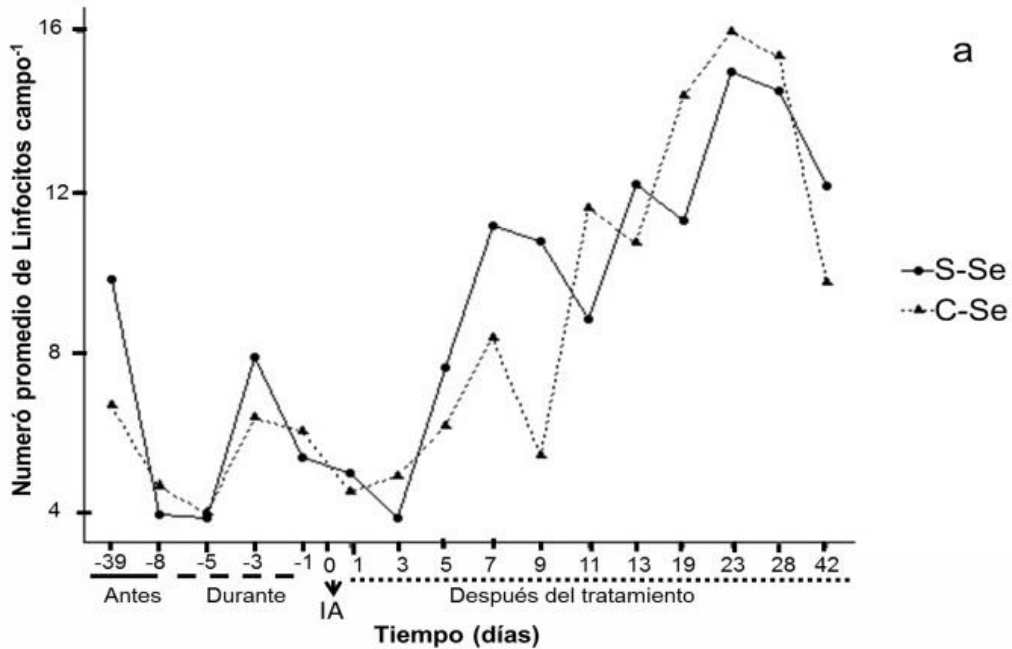


Figura 1a y 1b. Comportamiento de linfocitos y neutrófilos durante y después de la aplicación de selenio en ovejas locales (raza indefinida). S-Se: sin selenio, C-Se: levadura enriquecida con “selenio orgánico”, dosis (0.03 mg); -39, -8: días antes del inicio del tratamiento; -5, -3, -1: muestras durante el tratamiento; 1: inicio de la gestación; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 19, 23, 28 y 42: días del desarrollo embrionario de la oveja. IA: Inseminación Artificial. *: Indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

Las células sanguíneas blancas que presentaron mayor porcentaje en esta investigación fueron los linfocitos (55.06 %), neutrófilos (29.22 %) y monocitos (8.26 %); y en menor cantidad los basófilos y eosinófilos con 0.70 % y 4.46 %, respectivamente. Respecto a los tratamientos se muestra ligera elevación de valores promedios en borregas con adición de “selenio orgánico” (C-Se; 58.0 %), mientras que S-Se 41.95 %, no obstante, no hubo diferencias estadísticas ($P \geq 0.05$); esto puede deberse a eventos externos e internos del animal, como fisiología normal considerada como tendencia a mantener homeostasis o patológica. Estos resultados concuerdan con Yue *et al.* (2009) y Brown *et al.* (2000), que, al evaluar diferentes grupos de tratamiento con selenio, no se presentaron diferencias significativas en las variables evaluadas. Brown *et al.* (2000) y mencionan que, a pesar de la variación numérica de los valores, la no diferencia es debida a variación en respuestas interindividuales.

En cuanto a los basófilos, se observó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre tratamiento y en el tiempo; el día -3 mostró disminución del valor promedio de células basófilas para el tratamiento C-Se (1.05 ± 0.23), en comparación con el grupo S-Se (1.85 ± 0.31). El día 5, 7 y 9 del desarrollo embrionario se observó disminución de basófilos y eosinófilos (figura 2a, b).

Estos días corresponde al momento de la formación del blastocisto (5-6 días) y empieza una etapa inflamatoria, de acuerdo a lo descrito por Delves y Roitt (2000), estas células (basófilos y eosinófilos) son mediadores inflamatorios. Canalejo *et al.*, (2007) no encontraron diferencias en basófilos, eosinófilos y linfocitos durante el tiempo de gestación a pesar de ser ésta una etapa con presencia de inflamación de tejido uterino. En enfermedades como la

inflamación alérgica, los números de eosinófilos aumentan notablemente en la sangre y los tejidos, donde se localiza la inflamación (Davoine y Lacy, 2014).

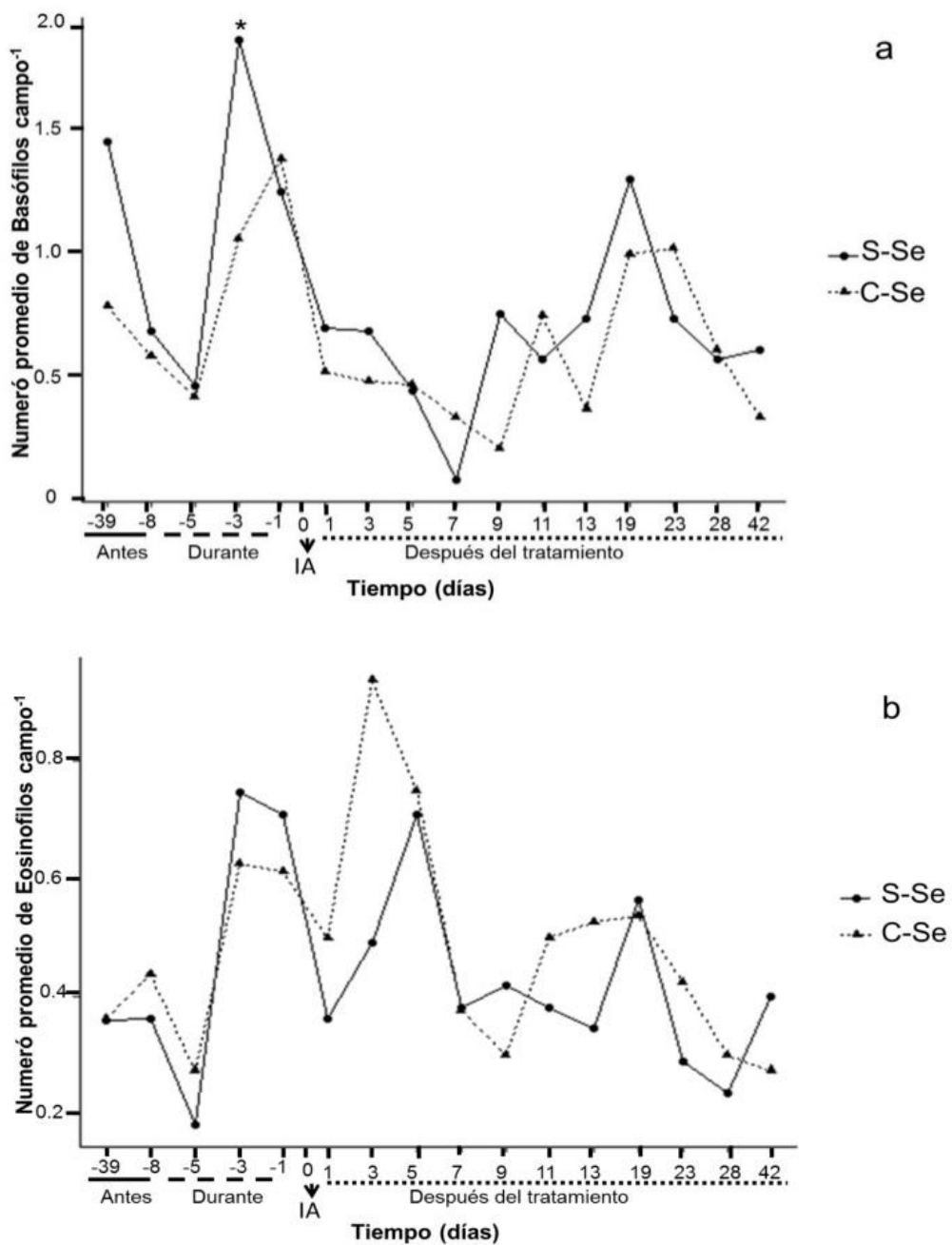


Figura 2a y 2b. Comportamiento de basófilos y eosinófilos durante y después de la aplicación de selenio en ovejas locales (raza indefinida). S-Se: sin selenio, C-Se: levadura

enriquecida con “selenio orgánico”, dosis (0.03 mg); -39, -8: días antes del inicio del tratamiento; -5, -3, -1: muestras durante el tratamiento; 1: inicio de la gestación; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 19, 23, 28 y 42: días del desarrollo embrionario de la oveja. IA: Inseminación Artificial *: Indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

A partir del día 11 del desarrollo embrionario los valores de las células sanguíneas blancas aumentan (figura 1 y 2), considerando que los días posteriores se presentan procesos fisiológicos; en el día 13 ocurre la implantación embrionaria en las ovejas y el establecimiento de placentomas, se registra de 30-80 días (Byers y Kramer, 2010). El aumento registrado en las células sanguíneas blancas posterior a los eventos fisiológicos; aquí comentados, puede no tener causa directa sobre el embrión, dado que para este momento la barrera placentaria se está desarrollando y sirve de protección directa al embrión.

1.6 CONCLUSIONES

Se concluye que la administración de “selenio orgánico” (0.3 mg), disminuye el número de neutrófilos y basófilos, después de formarse el blastocisto y cuatro días después de iniciado el tratamiento. Las diferencias estadísticas por tiempo se deben a factores fisiológicos del desarrollo embrionario. No se encontró diferencias estadísticas en linfocitos, monocitos, eosinófilos.

1.7 LITERATURA CITADA

- AHSAN U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz MH, Iqbal Z. 2014. Role of selenium in male reproduction: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 146(1-2): 55-62. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.009.
- BROOME CS, McArdle F, Kyle JA, Andrews F, Lowe NM, Hart CA, Arthur JR, Jackson MJ. 2004. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *Am. J Clin Nutr.* 80(1): 154-162. DOI: 10.1093/ajcn/80.1.154.
- BROWN KM, Pickard K, Nicol F, Beckett GJ, Duthie Gg, Arthur JR. 2000. Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clinical Science.* 98(5): 593-599. DOI: 10.1042/CS19990276.
- BYERS SR, Kramer JW. 2010. Normal hematology of sheep and goats. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Ames, IA: Blackwell Publishing; 2010. p. 836-842. <http://www.worldcat.org/title/schalms-veterinary-hematology/oclc/338288636>.
- CANALEJO K, Tentoni J, Aixalá M, Jelen AM. 2007. Valores de referencia del hemograma en embarazadas, con tecnología actual. *Bioquímica y Patología Clínica.* 71(2): 52-54. ISSN: 1515-6761.
- DAVOINE F, Lacy P. 2014. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front. Immunol.* 5: 570. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00570.
- DELVES PJ, Roitt IM. 2000. The Immune System. *The New England J. Med.* 343(1): 37-49. DOI:10.1056/NEJM200007063430107.
- ERDOGAN S, Karadas F, Yilmaz A, Karaca S. 2017. The effect of organic selenium in feeding of ewes in late pregnancy on selenium transfer to progeny. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 46(2): 147-155. ISSN: 1806-9290. DOI: 10.1590/S1806-92902017000200010.
- GUERIN LR, Prins JR, Robertson S. 2009. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update.* 15(5): 517-535. DOI: 10.1093/humupd/dmp004.
- HOFFMANN RP, Berry JM. 2008. The influence of selenium on immune responses. *Mol. Nutr. Food Res.* 52(11): 1273-1280. DOI: 10.1002/mnfr.200700330.
- HUANG Z, Rose AH, Hoffmann PR. 2012. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling.* 16(7): 705-743. DOI: 10.1089/ars.2011.4145.
- INAFED (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal) 2018. Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México. Disponible:

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15028a.html>.

- LYONS MP, Papazyan TT, Surai PF. 2007. Selenium in food chain and animal nutrition: Lessons from Nature. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 20(7): 1135-1155. DOI: 10.5713/ajas.2007.1135.
- MARTÍNEZ AOA, Villaseñor EN, Kuribreña AJC, Vega SE. 2011. Modulación de la respuesta inmunológica durante el embarazo. *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 37(2): 277-287. ISSN 0138-600X.
- RAYMAN MP. 2012. Selenium and human health. *Lancet*. 379(9822): 1256-1268. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61452-9.
- ROCK MJ, Kincaid RL, Carstens GF. 2001. Effects of prenatal source and level of dietary selenium on passive immunity and thermos metabolism in new born lambs. *Small Ruminant Research*. 40(2): 129-138. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(01\)00167-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(01)00167-5).
- SAS, 2002. Versión 9.0 for Windows edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- SHARMA RK, Agarwal A. 2004. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reprod Med Bio*. 3: 177-199. DOI: 10.1111/j.1447-0578.2004.00068.x.
- SPEARS JW. 2011. Selenium deficiency and its prevention in grazing ruminants. Salt and Trace Minerals. Disponible: <http://saltinstitute.org/wp-content/uploads/2013/05/4th-qtr-2011.pdf>
- STEWART WC, Bobe G, Pirelli GJ, Mosher WD, Hall JA. 2012. Organic and inorganic selenium: III. Ewe and progeny performance. *Journal of Animal Science*. 90(12): 4536-4543. DOI: 10.2527/jas2011-5019.
- TARGETMAP. 2013. Distribución de selenio en México por Estado. Disponible: <https://www.targetmap.com/viewer.aspx?reportId=25908>
- YUE W, Zhang C, Shi L, Ren Y, Jiang Y, Kleemann O. 2009. Effect of supplemental selenomethionine on growth performance and serum antioxidant status in Taihang black goats. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 22(3): 365-370. ISSN: 1011-2367, DOI: 10.5713/ajas.2009.80474.

CAPÍTULO II. ACCIÓN DEL SELENIO SOBRE LEUCOCITOS DE OVEJAS GESTANTES Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN SU DESCENDENCIA

2.1 RESUMEN

En la presente investigación se partió de la hipótesis: El selenio que se aplica antes de iniciar la gestación aumenta el número de leucocitos en ovejas y se refleja en parámetros productivos de su descendencia. El objetivo de la presente investigación fue conocer si el “selenio orgánico” aplicado a ovejas antes de la inseminación artificial (IA) y gestación aumenta el número de leucocitos durante la gestación (etapa fetal) y mejora algunos parámetros productivos de sus crías. Se realizó esta investigación con 27 ovejas locales del municipio de Chiautla, Estado de México. Las ovejas se dividieron en dos grupos: 1) testigo (S-Se; n=11) con 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ de selenio contenido en el alimento y 2) tratado (C-Se; n=16) con adición de 0.3 mg animal⁻¹ día⁻¹ de “selenio orgánico” más 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ de selenio contenido en el alimento (0.54 mg animal⁻¹ día⁻¹: concentración final), durante 7 días antes de inseminarlas. Se realizó conteo diferencial de leucocitos en frotis sanguíneo elaborados de cada oveja (periodo de 42-140 días de gestación). Se registró el peso de corderos y corderas al nacimiento y destete. El número de neutrófilos se elevó a los 42 (P=0.04) y 104 días (P<0.0001) de gestación en ovejas S-Se y se mantuvo bajo C-Se, de igual manera disminuyó el número de basófilos durante la gestación. No se encontraron diferencias para el resto de leucocitos. El sexo y el selenio influyeron en el peso al destete; las corderas presentaron mayor peso. El selenio aplicado antes de la IA afectó el número de neutrófilos y basófilos durante la gestación y aumentó el peso de corderas al destete.

Palabras clave: gestación, selenio, glóbulos blancos, destete.

2.2 ABSTRACT

The hypothesis of the work was: Selenium administered to ewes before pregnancy increases the leucocytes number and is reflected in productive parameter of their offspring. In order to know if organic selenium administered before artificial insemination and pregnancy improve leukocyte number during pregnancy and improve some productive parameters of their offspring. The research was developed with 27 local ewes, from Chiautla, México State. Ewes were divided in two groups: 1) control (S-Se; n=11) with 0.24 mg animal⁻¹ day⁻¹ with only selenium in diet, 2) tested group (C-Se; n=16) with 0.3 mg animal⁻¹ day⁻¹ of organic selenium plus 0.24 mg animal⁻¹ day⁻¹ from diet (total selenium 0.54 mg animal⁻¹ day⁻¹), selenium was administered through 7 consecutive days before artificial insemination and gestation. Leukocytes were counted in blood smear from samples taken from each ewe at 42 to 140 days through gestation. At moment of birth we recorded: weight birth and weaning weight (60 days after birth) from females and males. Neutrophils were increased on days 42 ($P = 0.04$) and 104 ($P = 0.0001$) of gestation in S-Se group and was lower in C-Se group, similarly, basophils were lower during gestation ($P \leq 0.02$). No differences ($P \geq 0.05$) were found in the rest of leukocytes. Selenium increase weaning weight ($P \leq 0.20$) and the female lambs were the ones with highest weight ($P \leq 0.13$). Selenium administered before artificial insemination affected the neutrophils and basophils numbers through gestation buy increase weaning weight of female lamb.

key words: Gestation, selenium, white blood cells, weaning.

2.3 INTRODUCCIÓN

La vida reproductiva de una hembra está marcada por diferentes fases fisiológicas, que culminarán en el nacimiento de descendientes sanos, capaces de desarrollarse de forma adecuada y que garanticen el mantenimiento de la especie. Al inicio del proceso de gestación se consideran la condición fisiológica del óvulo y el espermatozoide; células que se unirán para comenzar con la gestación. El progreso de la gestación depende en parte del papel relevante que juega la respuesta inmunitaria en la hembra gestante y la tolerancia hacia el embrión o feto (producto) (Rico y Vega, 2012).

La inmunidad debe estar al acecho para defender tanto al “producto” como a la madre de agentes patógenos que pudieran poner en riesgo la salud de ambos. La inmunidad innata está dada por células leucocitarias y moléculas, de éstas, los neutrófilos son las primeras células que inician el combate ante el agente que resulta extraño al organismo. Existe poca información sobre la inmunidad durante la gestación en animales; sin embargo, se cuenta con estudios en *Bos taurus* (Oliveira *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2013; Esposito *et al.*, 2014) y con mayor amplitud, en mujeres (Rico y Vega, 2012; Torres *et al.*, 2013). Desajustes en el mecanismo de inmunidad pueden causar interrupción de la gestación, por ejemplo, en mujeres se ha observado que mecanismos autoinmunes producen dicha reacción (Kwak-Kim *et al.*, 2016). Es importante destacar la atención especial de los minerales traza (como; cobre, zinc, y selenio) (Hall *et al.*, 2014; Carczyńska *et al.*, 2018), ya que niveles adecuados de éstos en la dieta y la calidad en la alimentación otorgada antes y durante la gestación pueden mejorar la respuesta inmune (Roche *et al.*, 2018).

Existen investigaciones que han permitido conocer la importancia del selenio en el funcionamiento del sistema inmune (Avery y Hoffman, 2018) y su papel como inmunonutriente en ovejas enfermas (Hall *et al.*, 2011).

De forma general el selenio mejora la respuesta al estrés oxidativo y reduce la gravedad de varias patologías (Sordillo, 2013). Tiene la propiedad de ser transferido de la madre a la cría y puede modificar el comportamiento productivo e inmunitario de la cría (Carczyńska *et al.*, 2018; Moeini *et al.*, 2011; Wallance *et al.*, 2017); también, aumenta la masa fetal (Lekatz, 2010; Meyer *et al.*, 2010) y promueve mayor tasa de crecimiento al destete (Parraguirre *et al.*, 2015).

Existen pocos estudios recientes encaminados a dilucidar el efecto de selenio en el sistema inmune otorgado por linfocitos a ovejas (Finch y Turner, 1996; Koyuncu y Yerlikaya, 2006; Muñoz *et al.*, 2009). En la investigación realizada por López *et al.* (2019) con ovejas en etapa de desarrollo embrionario que recibieron selenio, se encontró disminución en neutrófilos y basófilos, es decir, el selenio no confirió inmunidad mediante estos tipos celulares en etapa embrionaria. La etapa de desarrollo embrionario y fetal difieren en eventos fisiológicos. Por lo tanto, la presente investigación se realizó para conocer si el “selenio orgánico” aplicado a ovejas antes de la IA y gestación aumenta el número de leucocitos durante la etapa fetal y algunos parámetros productivos de sus crías.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el municipio de San Andrés Chiautla, Estado de México, localizado en las coordenadas geográficas; 19°36'19" latitud norte, 98°54'38" longitud oeste,

con altitud de 2260 msnm, clima templado-semiseco y temperatura media anual de 19 °C; con máxima de 32 °C y mínima de 6 °C (INAFED, 2020).

Se utilizaron 27 ovejas locales de raza indefinida, multíparas con peso de 37.02 ± 7.3 kg, edad promedio de 3.5 años y condición corporal de 2.5 en escala de 1 a 5. Antes de iniciar la investigación, las ovejas se desparasitaron con ivermetina a dosis de 1mL para cada animal y se les aplicó vitamina (Complejo B). La sincronización de estro se realizó con esponjas intravaginales (CHRONOGEST) por 14 días; al retirar las esponjas se aplicaron 400 I.U. de eCG (Folligon) y se realizó IA, por el método de endoscopia. Para suministrar el selenio, las ovejas se asignaron al azar en dos grupos: 1) Testigo, sin selenio (S-Se; n=11); con $0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de selenio contenido en el alimento y 2) tratado (C-Se; n=16) con adición de $0.3 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de “selenio orgánico” más $0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de selenio contenido en el alimento (concentración final: $0.54 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$), vía oral. La fuente de “selenio orgánico” fue levadura enriquecida con selenio, la levadura se dosificó con base a su contenido de selenio y a lo recomendado por el NRC, para lugares deficientes en selenio (TARGETMAP, 2013). El selenio se suministró cada 24 h por siete días consecutivos antes de IA.

Durante el experimento las ovejas se mantuvieron en estabulación permanente, con alimentación a base de alfalfa achicalada y rastrojo de maíz. Para obtener información efectiva de la dosis de selenio, se realizó análisis de la concentración de selenio en el alimento; la cantidad de selenio encontrada en alimento fue de 0.24 mg kg^{-1} .

El diagnóstico de gestación se realizó 35 días posteriores a la IA, con ecógrafo portátil marca Draminski modelo 4Vet mini, con transductor abdominal 7.5 MHz; la exploración de

estructuras propias de gestación se hizo a nivel de la fosa iliaca, las ovejas se mantuvieron en ayuno por 12 h; el último momento de acceso al alimento fue a las 20:00 horas del día anterior.

Para realizar el conteo diferencial de leucocitos, se tomó una muestra sanguínea de cada oveja y se realizaron tres frotis con cada muestra; las muestras se tomaron a partir de los días 42 y 48 de gestación (inicio del desarrollo fetal) a partir de este momento se tomaron cada 15 días y hasta el parto (140 días). Los frotis sanguíneos se realizaron colocando una pequeña gota de sangre en el centro del portaobjetos, se colocó otro portaobjetos sobre la gota de sangre en ángulo de 45°, se dejó que la sangre se extendiera a todo el ancho del portaobjetos, la muestra se deslizó de forma uniforme y rápida para formar una película fina, bien distribuida de sangre, la película de sangre se secó a temperatura ambiente por aproximadamente 5 min; posteriormente, se aplicó etanol al 96 % para fijar la muestra. Para teñir la muestra, se sumergió el frotis de sangre en tinción de Hematoxilina Gill No.3 (Sigma-Aldrich) por 5 minutos y luego se lavó con agua destilada. La observación y conteo diferencial de leucocitos se realizó en cinco repeticiones (campos por muestra por frotis), con ayuda de un microscopio óptico de campo claro a resolución 40x.

Para conocer el efecto del selenio transferido de la madre a su progenie, se registró: el sexo del cordero nacido, (hembra o macho), tipo de parto (simple o doble), el peso de los corderos al nacer y el peso al destete de los corderos a 60 días de nacidos (destete).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2002). El número de leucocitos se analizó con diseño de medidas repetidas del procedimiento MIXED. El peso de corderos al nacer y destete fue analizado con el procedimiento GLM, en

este, se incluyó a la oveja como efecto aleatorio, como efecto fijo el sexo del cordero (macho o hembra) y tipo de nacimiento del cordero (sencillo o doble).

Los resultados para leucocitos se consideraron estadísticamente significativos cuando $P \leq 0.05$, y para las variables peso al nacimiento y destete (debido al tamaño de muestra) cuando $P \leq 0.20$, mientras las diferencias para peso por sexo fueron tomadas cuando $P \leq 0.13$, las medias se compararon mediante la prueba de Tukey.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El suministro de selenio a ovejas antes de la IA y después de ser gestadas no afectó el número de linfocitos, monocitos, eosinófilos y macrófagos durante la fase de desarrollo fetal ($P \geq 0.05$).

En ovejas S-Se se observó aumentó en número de los neutrófilos, el día 42 y 104 de la gestación, esta elevación no fue observada en ovejas C-Se ($P \leq 0.05$), donde se registró poca variación a lo largo de la gestación (Figura 1). De igual manera se encontró diferencia significativa en basófilos con un promedio de 0.174 ± 0.03 en ovejas C-Se y 0.282 ± 0.03 en ovejas S-Se durante el desarrollo fetal (Figura 2). El comportamiento de leucocitos en ovejas gestantes no se ha estudiado de manera amplia a pesar de estar implicados en la respuesta inmune.

Se ha observado que mujeres con embarazo normal presentan aumento de linfocitos en sangre (Sanci *et al.*, 2017), por lo contrario, mujeres con disminución de linfocitos en sangre periférica tienen abortos espontáneos. Sin embargo, la respuesta inmune entre mujeres y

ovinos durante la gestación es diferente y pudiera estar determinada por el tipo de placentación (Wattegedera *et al.*, 2008).

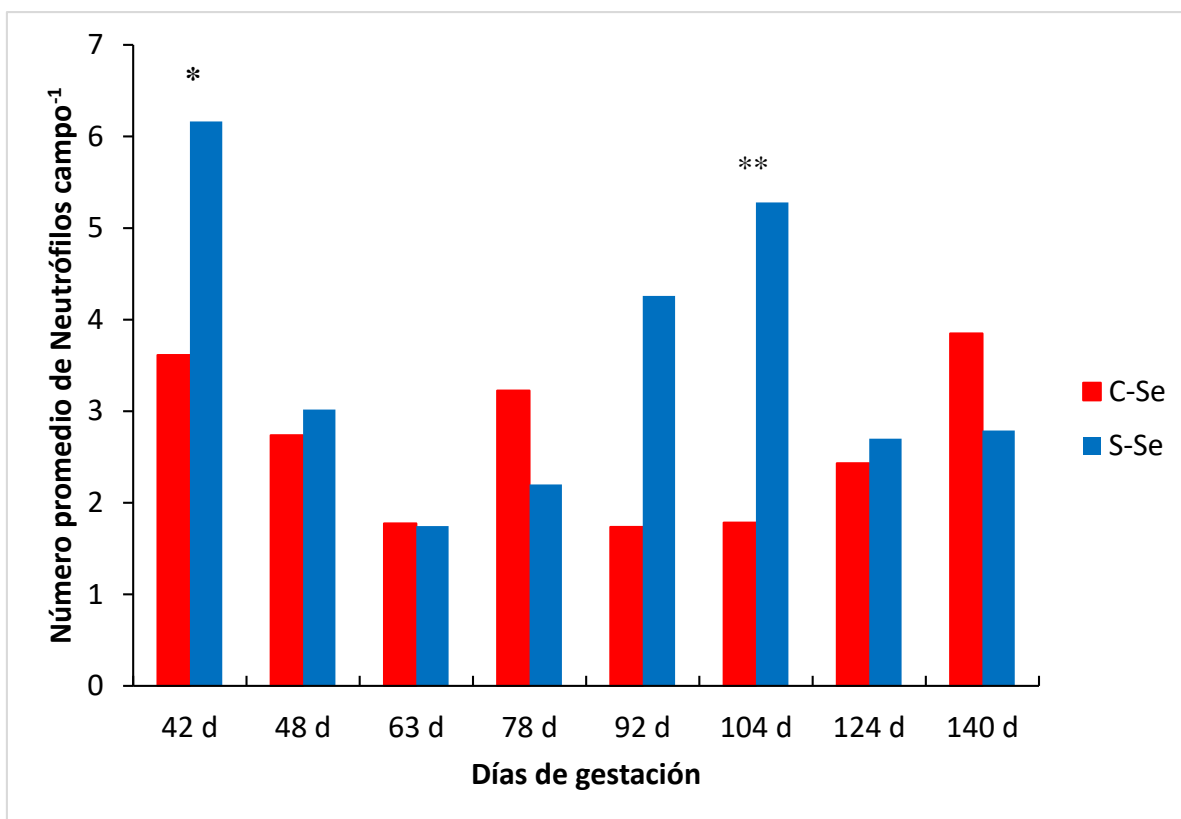


Figura 1. Gráfica sobre número promedio de neutrófilos por campo microscópico, en frotis sanguíneos obtenidos de ovejas con aplicación de “selenio orgánico” antes de la IA y de la gestación. S-Se= Testigo con selenio contenido en el alimento ($0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$), C-Se= adición de selenio en levadura a dosis de $0.3 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ más $0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de selenio contenido en alimento (concentración final: $0.54 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$). * Diferencia estadística significativa.

En esta investigación no se encontró efecto de selenio en la mayoría de leucocitos evaluados, resultados similares se observaron en el estudio de Sterndale *et al.* (2018), donde

se utilizó selenito de bario y se evaluó la inmunidad en los corderos nacidos de las ovejas que recibieron selenio, tampoco encontraron elevación de las células inmunes.

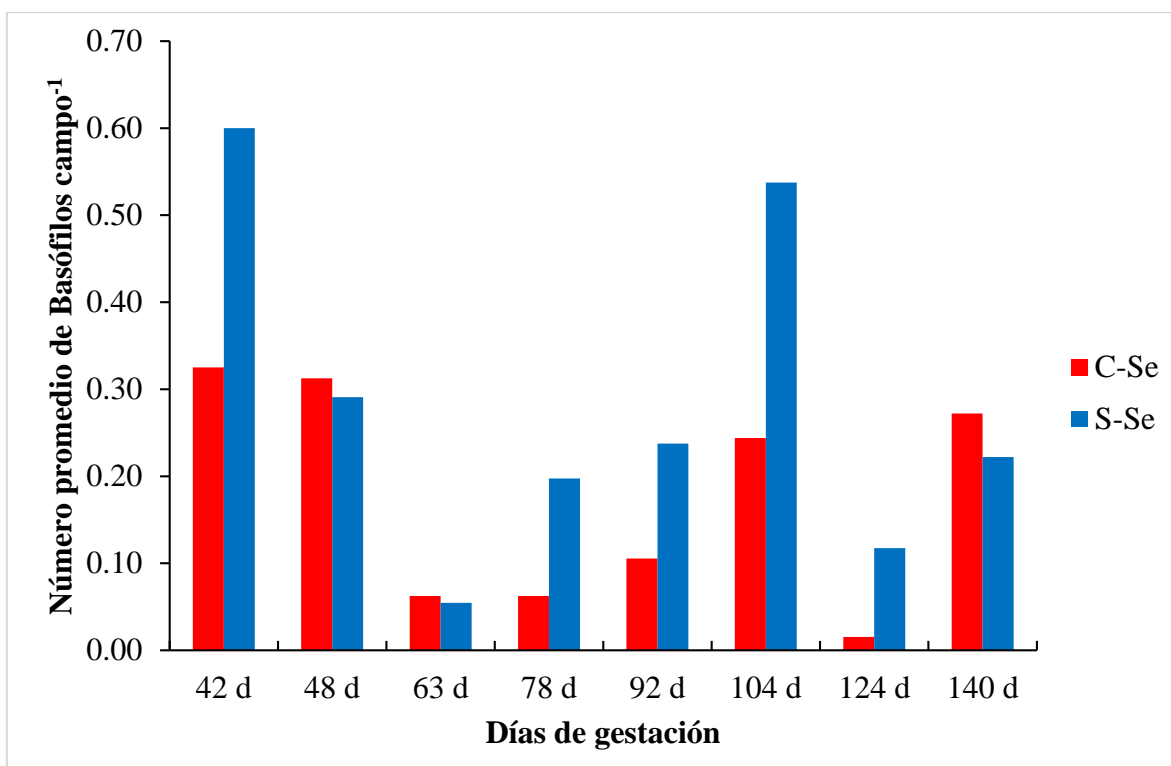


Figura 2. Número promedio de basófilos por campo microscópico, en frotis sanguíneos obtenidos de ovejas con aplicación de “selenio orgánico” antes de la IA y de la gestación. S-Se= Testigo con selenio contenido en el alimento ($0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$), C-Se= adición de selenio en levadura a dosis de $0.3 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ más $0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de selenio contenido en alimento (concentración final: $0.54 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$).

Durante toda la gestación de las ovejas el porcentaje de leucocitos no mostró diferencias, a excepción de los monocitos (Plaza *et al.*, 2019). En el presente estudio ovejas S-Se presentaron menor número de neutrófilos en los días 40 y 100, esta disminución puede ser necesaria durante este momento de la gestación; siendo el día 40 coincidente con el inicio del desarrollo fetal y el día 100 con la proximidad del último tercio. La falta de incremento

en el número de neutrófilos también fue observada por López *et al.* (2019) durante el desarrollo embrionario; no obstante, Pramanik *et al.* (2007) reportaron un aumento gradual en el número de neutrófilos conforme avanzó la gestación.

Si consideramos que las ovejas S-Se presentaron aumento en el número de neutrófilos y que las ovejas C-Se mantuvieron poca variación durante los días de muestreo, se puede decir que el selenio produce tendencia a mantener estabilidad en la inmunidad de ovejas gestantes conferida por neutrófilos. Los neutrófilos son el componente celular más numeroso e importante de la inmunidad innata, son la primera línea de defensa contra los microorganismos invasores que los fagocitan o destruyen. Los neutrófilos como células fagocíticas pueden eliminar bacterias, hongos o restos celulares, la elevación de estas células se registra cuando se administra selenio a ovejas con patologías como pododermatitis (Hugejiletu *et al.*, 2013).

Las ovejas utilizadas en esta investigación estaban clínicamente sanas, no presentaron alteración o síntomas de enfermedad, por lo tanto, la elevación de neutrófilos en ovejas S-Se se puede atribuir a estado fisiológico normal de la gestación. A partir del día 40 se considera el inicio del desarrollo fetal en las ovejas; a los 42-49 días aparecen los folículos pilosos (Smok *et al.*, 2014) que pueden ser causa de estrés para la oveja y reflejarse en elevación de neutrófilos, como se observó en esta investigación. La elevación a los 100 d corresponde con el último tercio de gestación relacionada con crecimiento acelerado del feto (Smok *et al.*, 2014), y aumento en la masa ósea y de la médula ósea (Chandra *et al.*, 2012); tejidos que dan origen a las células sanguíneas blancas a excepción de los linfocitos que tienen origen linfoide.

En esta investigación el peso al nacimiento no se modificó por el suministro de selenio ni por el tipo de nacimiento o sexo ($P \geq 0.05$; cuadro 1). Estos resultados coinciden con los obtenidos con otros investigadores (Koyunku y Yerlikaya, 2006; Muñoz *et al.*, 2009; Neville *et al.*, 2010; Hammer *et al.*, 2011), donde el peso de los corderos al nacer tampoco se afectó por la fuente o el nivel de selenio; aunque presentaron mayor peso (Testigo, 4.4 ± 0.3 kg; C-Se, 4.5 ± 0.2 kg) (Erdoğan *et al.*, 2017).

De la misma manera Parraguirre *et al.* (2015) reportaron pesos superiores (control, 5.3 ± 11 kg; 5.6 ± 99 kg, C-Se) a los registrados en la presente investigación (2.7 ± 0.3 kg para ovejas S-Se y 2.8 ± 0.3 kg C-Se). El peso presentado por los corderos al nacer en esta investigación puede deberse a la condición corporal, a la raza (ovejas locales), o bien a que este es el rango de peso considerado para los corderos locales. La mayoría de los investigadores mencionan que el peso al nacer no está influenciado por la suplementación con selenio. En contraste con otros estudios (Meyer *et al.*, 2010; Stewart *et al.*, 2012), en los que se encontró aumentó en los pesos al nacimiento con la suplementación de selenio.

Los pesos al destete mostraron diferencias ($P \leq 0.20$; cuadro 1). Si bien, el valor de $P \leq 0.20$ permite observar que las diferencias no son altamente significativas, esto se puede atribuir al tamaño reducido de muestra. Existen reportes en donde al suplementar selenio no encontraron efecto significativo en peso al destete (Chandra *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2012; Yavuzer y Bengisu, 2014). En contraste con Koyuncu y Yerlikaya (2006) que reportaron mayor peso al destete en corderos nacidos de ovejas suplementadas con selenio en comparación con los del grupo testigo. En otro estudio se encontró aumento de peso en corderos de madres que recibieron dosis de selenio de liberación lenta (bolos) (Zarbalizadeh *et al.*, 2010).

En la presente investigación se encontró diferencia estadística en peso al destete de corderas nacidas de madres C-Se ($P \leq 0.13$), aunque similar al resultado en peso al destete con valor de p alto. Basado en estos resultados, se recomienda elevar el número de animales por grupo en futuras investigaciones. Aunque con valor de p alto, estos resultados permiten observar que el peso al destete de corderas nacidas de borregas que recibieron selenio antes de la IA y por supuesto de ser gestadas es beneficiado por el selenio.

Cuadro 1. Medias de parámetros productivos de corderos nacidos, como efecto a la aplicación de “selenio orgánico” antes de la inseminación artificial (IA) y de la gestación.

(Media \pm error estándar).

	S-Se	C-Se	P-value
Peso al nacimiento (kg)	2.7 \pm 0.3	2.8 \pm 0.3	
Tipo de Nacimiento:			
Sencillo	3.1 \pm 0.4	3.4 \pm 0.4	
Doble	2.4 \pm 0.5	2.1 \pm 0.5	
Sexo:			
Macho	2.9 \pm 0.3	2.9 \pm 0.3	
Hembra	2.5 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3	
Peso al destete 60 d (kg)	7.8 \pm 1.0a	9.5 \pm 0.8b	0.20
Tipo de Nacimiento:			
Sencillo	9.7 \pm 1.1	11.3 \pm 1.0	
Doble	6.0 \pm 1.7	7.7 \pm 1.2	
Sexo:			
Macho	9.7 \pm 1.4	9.4 \pm 1.2	
Hembra	6.0 \pm 1.2a	9.6 \pm 1.0b	0.13

S-Se= Testigo con selenio contenido en el alimento (0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹), C-Se= adición de selenio en levadura a dosis de 0.3 mg animal⁻¹ día⁻¹ más 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ de selenio contenido en alimento (concentración final: 0.54 mg animal⁻¹ día⁻¹). ^{a,b} Diferentes literales en la misma fila, indican diferencias ($P \leq 0.20$).

2.6 CONCLUSIONES

El selenio aplicado antes de la IA afectó el número de neutrófilos y basófilos durante la gestación y aumentó el peso al destete de las corderas provenientes de madres suplementadas con selenio. No se encontró diferencias para el resto de leucocitos y peso al nacimiento.

Agradecimientos y conflictos de interés

Se extienden toda nuestra gratitud a los productores de ovinos que permitieron la utilización de sus ovejas para la realización de la investigación.

Esta investigación se realizó dentro del programa de actividades de la LGAC Innovación Tecnológica y Calidad Alimentaria en Ganadería.

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

2.7 LITERATURA CITADA

1. Avery, C.J. and Hoffmann, R.P. (2018). Selenium, selenoproteins and immunity. *Nutrients*, 10(1203): 1-4. DOI: 10.3390/nu10091203.
2. Carczyńska K, Snarska A, Rytel L, Sobiech P. (2018). Effect of a single-dose parenteral selenium supplement administered to pregnant dairy cows on selenium and iron concentration and immune status of calves. *Polish Journal of Veterinary Science*, 21(2): 401-403. DOI: 10.24425/119045.
3. Chandra, S., Tripathi, A.K., Misra, S., Amzarul, M. and Vaish, A.K. (2012). Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. *Indian Journal Hematology Blood Transfusion*, 83(3):1 44-146. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3422383/#:~:text=Post%20pregnancy%2C%20plasma%20volume%20decreases,Later%2C%20it%20again%20decreases.>
4. Erdoğan, S., Karadaş, F., Yılmaz, A. and Karaca, S. (2017). The effect of organic selenium in feeding of ewes in late pregnancy on selenium transfer to progeny. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(2): 147-155. DOI.org/10.1590/s1806-92902017000200010.
5. Esposito, G., Irons, P.C., Webb, C.E. and Chapawanya A. (2014). Interaction between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in

- transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144: 60-71. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.11.007.
6. Finch, J.M. and Turner, R.J. (1996). Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Research in Veterinary Science*, 60: 97-106. DOI: 10.1016/s0034-5288(96)90001-6.
 7. Hall, J.A., Sendek, L.R., Chinn, M.R., Bailey, D.P., Thonstad, N.K., Wang, Y., Forsberg, E.N., Vorachek, R.W., Stang V.B., Van, S.J.R. and Bobe, G. (2011). Higher whole-blood selenium is associated with improved immune responses in footrot-affected sheep. *Veterinary Research*, 42(99): 2-11. DOI: [10.1186/1297-9716-42-99](https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-99).
 8. Hall JA, Bobe G. Vorachek WR, Kasper K, Traber MG, Mosher WD, Pirilli GJ, Gamroth M. (2014). Effect of supranutritional organic selenium supplementation on postpartum blood micronutrients, antioxidants, metabolites, and inflammation biomarkers in selenium-replete dairy cows. *Biology Trace Elements Research*, 161(3): 272-287. DOI: 10.1007/s12011-014-0107-4.
 9. Hammer, C.J., Thorson, J.F., Meyer, A.M., Redmer, D.A., Luther, J.S., Neville, T.L., Reed, J.J., Reynolds, L.P., Caton, J.S. and Vonnahme, K.A. (2011). Effects of maternal selenium supply and plane of nutrition during gestation on passive transfer of immunity and health in neonatal lambs. *Journal Animal Science*, 89(11): 3690-3698. DOI: [10.2527/jas.2010-3724](https://doi.org/10.2527/jas.2010-3724).
 10. Hujeriletu, H., Bobe, G., William, R. Vorachek, M., Gorman, E., Mosher, D.W., Pirelli, G.J. and Hall, J.A. (2013). Selenium supplementation alter gene expression profiles associated with innate immunity in whole-blood. *Biological Trace Element Research*, 154: 28-44. DOI: 10.1007/s12011-013-9716-6.
 11. INAFED. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México. Municipio de Chiautla. 2020. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/index.html>.
 12. Koyuncu, M. and Yerlikaya, H. (2006). Effect of selenium-vitamin E injections of ewes on reproduction and growth of their lambs. *South African Journal of Animal Science*, 37(3): 233-236. Disponible en: [http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.912.958&rep=rep1&type=pdf#:~:text=Data%20obtained%20in%20this%20study,at%2060%20days%20of%](http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.912.958&rep=rep1&type=pdf#:~:text=Data%20obtained%20in%20this%20study,at%2060%20days%20of%20).
 13. Kwak-Kim, J., Skariah, A., Salazar, D., Sung, N. and Ota, K. (2016). Humoral and cellular autoimmunity in women with recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures: a possible role of vit D. *Autoimmunity Reviews*, 10: 943-7. DOI: 10.1093/humrep/det424.
 14. Lekatz, L.A., Caton, J.S., Taylor, J.B., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. and Vonnahme, K.A. (2010). Maternal selenium supplementation and timing of nutrient restriction in pregnant sheep: Effects on maternal endocrine status and placental characteristics. *Journal Animal Science*, 88(3): 955-971. DOI: 10.2527/jas.2009-2152.

15. López, V.M.M., Miranda, J.L., Quero, C.A.R., Robledo, P.A. y Morales, V.S. (2019). Leucocitos en el desarrollo embrionario de ovejas como respuesta a “selenio orgánico”. *Abanico Veterinario*, 9: 1-9. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S244861322019000100103&lng=en&nrm=iso&tlng=es.
16. Maeda, Y., Ohtsuka, H., Tomioka, M. and Oikawa, M. (2013). Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells pregnancy in cows. *Veterinary Research Communication*, 37: 43-49. DOI: [10.1007/s11259-012-9545-7](https://doi.org/10.1007/s11259-012-9545-7).
17. Meyer, A.M., Reed, J.J., Neville, T.L., Taylor, J.B., Hammer, C.J., Reynolds, L.P., Redmer, D.A., Vonnahme, K.A. and Caton, J.S. (2010). Effects of nutritional plane and selenium supply during gestation on ewe and neonatal offspring performance, body composition, and serum selenium. *Journal Animal Science*, 88(5): 1786-1800. DOI: [10.2527/jas.2009-2435](https://doi.org/10.2527/jas.2009-2435).
18. Moeini, M.M., Kiani, A., Mikaeili, E. and Shabankareh, H.K. (2011). Effect of prepartum supplementation of selenium and vitamin E on serum Se, IgG concentrations and colostrum of heifers and on hematology, passive immunity and Se of their offspring. *Biololy Trace Elements Research*, 144: 529-537. DOI [10.1007/s12011-011-9148-0](https://doi.org/10.1007/s12011-011-9148-0).
19. Muñoz, C., Carson, A.F., McCoy, M.A., Dawson, L.E., Irwin, D., Gordon, A.W. and Kilpatrick, D.J. (2009). Effect of supplementation with barium selenate on the fertility, prolificacy and lambing performance of hill sheep. *Veterinary Record*, 164(9): 265-271. DOI: [10.1136/vr.164.9.265](https://doi.org/10.1136/vr.164.9.265).
20. Neville, T.L., Caton, J.S., Hammer, C.J., Reed, J.J., Luther, J.S., Taylor, J.B., Redmer, D.A., Reynolds, L.P. and Vonnahme, K.A. (2010). Ovine offspring growth and diet digestibility are influenced by maternal selenium supplementation and nutritional intake during pregnancy despite a common postnatal diet. *Journal Animal Science*, 88(11): 3645-3656. DOI: doi.org/10.2527/jas.2009-2666.
21. Oliveira, L.J., Barreto, R.S.N., Perecin, F., Mansouri, A.N., Pereira, F.T.V. and Meirelles, F.V. (2012). Modulation of maternal immune system during pregnancy in cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4): 384-398. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2012.02102.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02102.x).
22. Parraguirre, E.A., Miranda, J.L. y Herrera, H.J. (2015). Complemento con selenometionina a ovejas gestantes y efecto el desarrollo de sus corderos. *Agroproductividad*, 8(6): 52-58. Disponible en: <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/697>.
23. Plaza, C.A., Hernández, P.E., Rugeles, P.C., Vergara, G.O. y Herrera, B.Y. (2019). Perfil hematológico durante la gestación de Ovinos de Pelo Criollos (*Ovis aries*) en el departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 11(1): 1-9. Disponible en: <https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/657>.

24. Pramanik, S.S., Pramanik, T., Mondal, S.C. and Chanda R. (2007). Number, maturity and phagocytic activity of neutrophils in the three trimesters of pregnancy. *East Mediterr Health Journal*, 13(4): 862-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17955769/>.
25. Rico, R.M.G., y Vega, R.G.B. (2012). Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecología y obstetricia de México*, 80(5): 332-340. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgibin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=34811>.
26. Roche, J.R., Burke, C.R., Crookenden, M.A., Heiser, A., Loor, J.L., Meier, S., Mitchel, M.D., Phyn, C.V.C. and Turner, S.A. (2018). Fertility and the transition dairy cows. *Reprod Fertility and Development*, 30(1): 85-100. DOI.org/10.1071/RD17412.
27. Sancı, M., Töz, E., Ince, O., Özcan, A., Polater, K., Inan, H.A., Beyan, E. and Akkaya, E. (2017). Reference values for maternal total and differential leukocytes counts in different trimesters of pregnancy and the initial postpartum periods in western turkey. *Journal Obstetrics and Gynaecology*, 37(5): 571-575. DOI:10.1080/01443615.2016.1268575.
28. SAS. (2002) Statistics, version 9.0 ed. SAS Inst. Inc SAS, USA, Cary NC.
29. Smok, C., Roa, I. y Rojas, M. (2014). Desarrollo fetal en mamíferos. *International journal of medical and surgical*, 1(2): 139-145. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/265162066_Desarrollo_Fetal_en_Mamifero_s.
30. Sordillo, L.M. (2013). Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. *Veterinary Medicine International*, 2013: 2-8. DOI:10.1155/2013/154045.
31. Sterndale, S., Broomfield, S., Currie, A., Hancock, S., Kearner, G.A., Lei, J., Liu, S., Lockwood, A., Scanlan, V., Smith, G. and Thompson, A.N. (2018). Supplementation of Merino ewes vitamin E plus selenium increases a-tocopherol and selenium concentration in plasma of the lamb but does not improve their immune function. *Animal*, 12(5): 139-145. DOI: 10.1017/S1751731117002300.
32. Stewart, W.C., Bobe, G., Pirelli, G.J., Mosher, W.D. and Hall, J.A. (2012). Organic and inorganic selenium: III. Ewe and progeny performance. *Journal Animal Science*, 90(12): 4536-4543. DOI.org/10.2527/jas.2011-5019.
33. TARGETMAP. Distribución de selenio en México por Estado. (2013). Disponible en: <https://www.targetmap.com/viewer.aspx?reportId=25908>.
34. Torres, L.A.M., Hernández, C.M.V. y Rodríguez, T.A.Y. (2013). Sistema Inmune y embarazo: características generales en mujeres sanas y en pacientes con artritis reumática. *Revista cubana de Reumatología*, XV(2): 76-52. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rcur/v15n2/rcur06213.pdf>.
35. Wallance, L.G., Bobe, G., Vorachek, W.R., Dolan, B.P., Estill, C.T., Pirelli, G.J. and Hall, J.A. (2017). Effects of feeding pregnant beef cows selenium-enriched alfalfa hay

on selenium status and antibody titers in their newborn calves. *Journal Animal Science*, 95(6): 2408-2420. DOI: 10.2527/jas.2017.1377.

36. Wattedgedera, S., Rocchi, M., Sales, J., Howard, C.J.J., Hope. C. and Entrican, G. (2008). Antigen-specific peripheral immune responses are unaltered during normal pregnancy in sheep. *Journal Reproduction Immunology*, 77(2): 171-178. doi.org/10.1016/j.jri.2007.07.003.
37. Yavuzer, U. and Bengisu, G. (2014). Effect of selenium on the reproductive performance of ewes and white muscle disease in lambs. *Indian Journal of Animal Resarch*, 48(3): 248-250. DOI: 10.5968/j.0976-0555.48.3.053.
38. Zarbalizadeh, S.A., Seifdavati, J., Abdi, B.H., Salem, Z.M.A., Barbosa, P.A., Camacho, D.L.M., Fadayifar, A. and Sharifi, S.R. (2010). Effect of slow-release pellets of selenium and iodine on performance and some blood metabolites of pregnant Moghani ewes and their lambs. *Biological Trace Element Research*, 195(2): 461-471. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-019-01853-w>.

CAPÍTULO III. RESPUESTA AL “SELENIO ORGÁNICO” ANTE EL ESTRÉS: PARÁMETROS FISIOLÓGICOS EN OVEJAS GESTANTES

3.1 RESUMEN

El selenio como antioxidante reduce el estrés y favorece la estabilidad fisiológica del animal. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta al “selenio orgánico” ante estrés por manejo en ovejas gestantes. Veintisiete ovejas adultas locales de la comunidad de San Andres Chiahutla, estado de México, se asignaron al azar en dos grupos: 1) testigo, con 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ de selenio contenido en el alimento (S-Se, n=11), 2) tratado o con adición de selenio 0.3 mg animal⁻¹ día⁻¹ contenido en levadura (C-Se; n=16) más 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ selenio en alimento (0.54 mg animal⁻¹ día⁻¹, concentración final). El selenio se suministró por vía oral, durante siete días. Se midieron algunos parámetros fisiológicos: temperatura rectal, frecuencia cardíaca y respiratoria, así como, concentración sanguínea de cortisol y selenio. Los datos se analizaron mediante procedimientos GLM y MIXED de SAS. La concentración de selenio en la sangre de ovejas S-Se fue mayor en el día nueve de gestación, el selenio disminuyó la frecuencia cardíaca, mientras, el nivel de la hormona cortisol se mantuvo estable durante todo el desarrollo gestacional. Se concluye que el “selenio orgánico” puede aumentar la concentración del mineral en la sangre; sin embargo, solo altera la frecuencia cardíaca y no altera los demás parámetros fisiológicos ni la concentración de cortisol (indicadores de estrés), ante estrés producido por manejo cotidiano en ovejas durante todo el desarrollo pre-gestacional y gestacional.

Palabras clave: Selenio, cortisol, temperatura rectal, frecuencia cardíaca y respiratoria.

3.2 INTRODUCCIÓN

Alteraciones fisiológicas se observan en organismos vivos que enfrentan factores estresantes. En animales la condición de estrés afecta la respuesta reproductiva-productiva. Los cambios ambientales y de manejo son factores estresantes para los animales y alteran su bienestar.

En ovejas los factores estresantes reducen el comportamiento normal del estro y la fertilidad (Dobson *et al.*, 2012). Además, el estrés por calor puede disminuir la calidad de leche y carne, así como, la producción, eficiencia reproductiva y sanidad animal (Sejian *et al.*, 2010), y se tiene mayor probabilidad de mortalidad embrionaria (Romo-Barron *et al.*, 2019).

Algunos indicadores fisiológicos de adaptación o presencia de estrés por calor son temperatura rectal (TR), frecuencia respiratoria (FR), frecuencia cardíaca (FC), entre otros (Indu y Pareek, 2015). En ovinos bajo condiciones de estrés por calor se observa aumento en la frecuencia respiratoria y frecuencia cardíaca (Wojtas *et al.*, 2014). Para restablecer la homeotermia y homeostasis en animales estresados por calor, se inician mecanismos fisiológicos compensatorios y adaptativos (Indu y Pareek, 2015).

Diversas investigaciones están enfocadas a contrarrestar el efecto del estrés en la producción-reproducción y calidad de la carne. La utilización de algunos oligoelementos se sugiere para disminuir el estrés. En particular, el selenio que posee propiedades antioxidantes, favorece la protección contra el estrés oxidativo, al eliminar radicales libres y permitir la homeostasis (Tinggi, 2008).

Ovejas con dietas altas en selenio y vitamina E tuvieron reducción en la frecuencia respiratoria y temperatura rectal (Chauhan *et al.*, 2015). De manera similar, cabras con adición de “selenio orgánico” en la dieta redujeron la producción de calor endógeno, frecuencia respiratoria, temperatura superficial en piel y mantuvieron la temperatura rectal dentro de los límites normales (Silveira *et al.*, 2019).

A nivel de reproducción-producción ganadera, el estado físico y nutricional de la madre, es fundamental para el buen desarrollo embrionario y fetal, así como del estado de la futura descendencia. Niveles supra nutricionales de selenio, pueden tener efectos positivos durante la gestación, particularmente en situaciones en las que los animales están estresados metabólicamente o nutricionalmente (Pappas *et al.*, 2019). Sin embargo, son escasos los estudios del efecto del selenio en la regulación de parámetros fisiológicos, que son marcadores de estrés o de estabilidad en el animal a lo largo de su vida productiva y reproductiva.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta al “selenio orgánico” ante el estrés producido por manejo normal en ovejas durante todo el desarrollo pre-gestacional y gestacional en ovejas.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el municipio de San Andrés Chiautla, Estado de México; con coordenadas geográficas 19°36'19" Latitud Norte y 98°54'38" Longitud Oeste, altitud de 2260 msnm. El clima es templado-semiseco, temperatura media anual de 19°C, con máxima de 32°C y mínima de 6°C (Inafed, 2018). El experimento se llevó a cabo de agosto a enero (140 días de gestación) en ovejas. En el Cuadro 1, se muestran los cambios en temperatura ambiental y humedad relativa durante el período de estudio (6 meses).

Se utilizaron 27 ovejas locales multíparas con condición corporal de 2.5 (escala de 1 a 5) y peso promedio de 37.02 ± 7.3 kg. Las ovejas se asignaron al azar en dos grupos: 1) testigo, sin selenio (S-Se; n=11), estas ovejas recibieron solo el selenio contenido en alimento (0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹), 2) con Selenio (C-Se; n=16) adición de 0.3 mg animal⁻¹ día⁻¹ de selenio en levadura más 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ de alimento el selenio contenido en el alimento (concentración final, 0.54 mg animal⁻¹ día⁻¹). El selenio se suministró cada 24 h por siete días consecutivos antes de inseminación artificial IA y al grupo S-Se se le administraron placebos vía oral.

La sincronización de estro se realizó con esponjas intravaginales (CHRONOGEST) por 14 días, al retirar las esponjas se aplicaron 400 IU de eCG (Folligon) y se realizó IA, por el método de endoscopia.

Los muestreos para la evaluación de variables a estudiar se realizaron antes del tratamiento, a los días 31 y un día antes del mismo (Pre- Trat). Durante el tratamiento, a los 5 y 7 días (Trat), y durante la gestación a partir del día 11 y hasta el día 140.

Durante todo el experimento las ovejas se mantuvieron en estabulación permanente y se alimentaron con dieta a base de alfalfa achicalada y rastrojo de maíz. Antes del inicio del tratamiento se desparasitaron y se les aplicó vitamina (Complejo B).

Para los análisis de la hormona cortisol y la concentración de selenio en sangre de selenio se tomaron muestras de sangre (10 mL), se centrifugó (1500 rpm; 15 min) para obtener suero y se conservó a -20 °C hasta su uso. La concentración de cortisol se analizó mediante la técnica de inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas y la concentración de selenio mediante la técnica espectrofotometría de emisión atómica acoplado a plasma (ICP).

Para evaluar los parámetros fisiológicos de cada oveja; antes de la extracción de sangre, se tomó la temperatura rectal (TR) con termómetro digital, frecuencia cardiaca (FC) y frecuencia respiratoria (FR) con un estetoscopio.

Para conocer la concentración final de selenio recibida por animal, se analizó la concentración de selenio en el suelo en el área de estudio (ND= no encontrado, sin selenio); con pH promedio de 6.9 ± 0.06 . En el alimento otorgado a las ovejas se encontraron 0.24 ± 0.6 mg kg⁻¹ de selenio; esta dosis fue considerada para saber la cantidad de selenio que recibió cada oveja en cada grupo (S-Se o C-Se).

El análisis de datos se realizó mediante el paquete estadístico Statistical Analysis Systems (SAS, 2002). En las variables: concentración de selenio y cortisol se utilizó el procedimiento MIXED; en variables fisiológicas se utilizó el procedimiento GLM. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 1. Valores ambientales registrados durante el periodo de estudio en la comunidad de Chiautla, Estado de México.

Mes	Temperatura (°C)		Humedad Relativa (%)	
	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
Agosto	20	14	93.7	60
Septiembre	24	15	84.2	38.4
Octubre	23	13.5	82.3	42.7
Noviembre	23.5	6	66.8	15
Diciembre	23	7.5	73.3	26
Enero	20.5	8.5	67.2	27.7
Promedio	22.3	10.7	77.9	43.9

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, la concentración sérica de selenio fue menor en ovejas que recibieron selenio (C-Se) en toda la gestación, asimismo, se observó diferencia significativa el día 9 de gestación (Figura 1). En ambos grupos, la concentración de selenio en la sangre comenzó a aumentar un día después de la IA y se mantuvo elevada hasta el día 140. Lo anterior coincide con otras investigaciones en las que observaron que la suplementación de las ovejas con selenio incrementó el contenido de este mineral en plasma, suero y sangre total (Carlson *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2012; Parraguirre *et al.*, 2015). Erdoğan *et al.* (2017) mencionan que la suplementación dietética con “selenio orgánico” a ovejas, al final de la gestación, aumenta la concentración del mineral en suero, placenta y calostro, relación al grupo control. Dado que las ovejas de ambos grupos recibieron dosis diferentes de selenio, los resultados indican que con la dosis mínima que se utilizó fue posible mantener la concentración elevada de selenio después de la inseminación artificial.

En condiciones de estrés por calor, la concentración sérica de selenio y el estado antioxidante total en plasma son mayores en ovejas con suplementos de selenio y vitamina E (Alhidary *et al.*, 2015). Al comparar estos resultados, se puede inferir que la disminución de selenio en ovejas C-Se puede deberse al equilibrio que ejerce el selenio como antioxidante, para no presentar toxicidad, contrarrestando su efecto, o tal vez la tendencia al equilibrio homeostático se altera cuando las ovejas se encuentran en condiciones estresantes. Otra posibilidad es la existencia de algún otro mecanismo protector contra el exceso de selenio, mediante el cual el organismo lo deja de absorber, encapsula o desecha con rapidez. Cualquiera de las posibilidades son ventanas de oportunidad para estudios futuros que profundicen en la explicación del metabolismo de selenio. Por tanto, el “selenio orgánico”

desempeña una función primordial en el primer tercio de la gestación y en ovejas gestantes con deficiencia en selenio o con un nivel estándar de selenio pueden mantener el equilibrio homeostático del animal durante este periodo.

El aumento de la concentración sérica de selenio en el día nueve registrado en borregas S-Se puede explicarse porque entre los 8-9 días el blastocisto se expande, lo que provoca que se rompa y pierda la zona pelúcida, por lo consiguiente, este aumento puede reflejarse en la utilización de selenio en su formación o mantenimiento embrionario o bien que el exceso de muerte celular con liberación de radicales libres produce aumento en la utilización de selenio. No obstante, Hall *et al.* (2012), encontraron que el selenio en sangre total disminuye principalmente durante la gestación en ovejas (-57% ; 258 a 111 ng mL⁻¹). Estos resultados pueden deberse a los niveles de selenio circulante alcanzados por la dosis administrada.

A los 140 días de gestación la concentración sérica de selenio entre los grupos no mostró diferencias en comparación con lo encontrado por Carlson *et al.* (2009), en donde a los 130 días de gestación la concentración de selenio fue mayor. Además, Hefnawy *et al.* (2014) informaron que hubo un aumento significativo en la concentración plasmática de selenio en ovejas gestantes suplementadas con el mineral durante la octava semana preparto. Asimismo, Pieczyńska y Grajeta (2015) mencionan que los cambios en la homeostasis del selenio durante el embarazo en mujeres, probablemente se deban a demanda de oxígeno en el cuerpo de la madre y el feto en desarrollo.

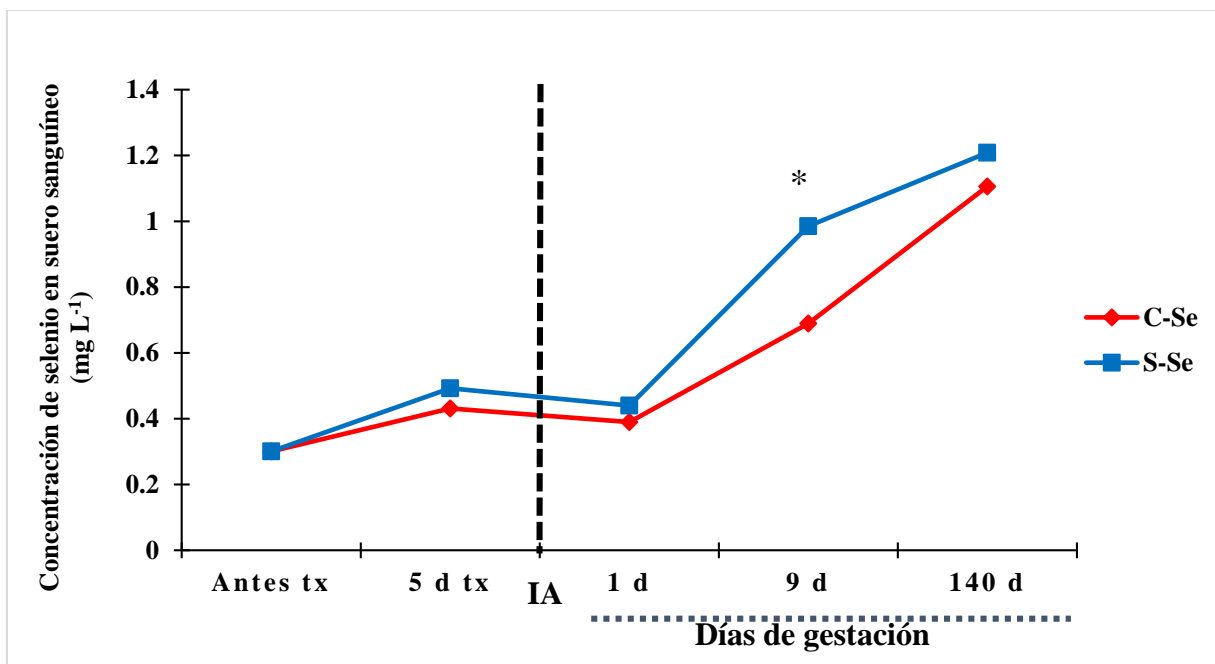


Figura 1. Concentración sérica de selenio en ovejas gestantes a las que se les adicionó “selenio orgánico” en levadura.

S-Se= Testigo con selenio contenido en alimento ($0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$), C-Se= adición de selenio en levadura a dosis de $0.3 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ más $0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de selenio contenido en el alimento; concentración final de $0.54 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Antes tx: 1 día antes del inicio del tratamiento; 5 d tx: 5 días durante el tratamiento; Días de gestación: 1, 9, y 140 contado a partir de un día después de la IA. * Indica diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de cortisol en el suero sanguíneo de las ovejas entre los tratamientos probados (Figura 2). Se reporta que, en ovinos los niveles basales de cortisol varían de 0.36 a $1.45 \text{ } \mu\text{g dL}^{-1}$ y bajo estímulo de la hormona ACTH pueden llegar a hasta $12.69 \text{ } \mu\text{g dL}^{-1}$ (Van Lier *et al.*, 2003). En este estudio, los valores de cortisol en las ovejas en el primer día de muestreo mostraron concentración más alta que

la basal ($2.85 \mu\text{g dL}^{-1}$), lo que puede asociarse al estrés ocasionado por el manejo de la primera vez que se realizó muestreo.

En ovejas en condiciones de estrés por calor y restricción de agua (2 y 3 h) así como en las ovejas testigo, no hubo diferencia en la concentración de cortisol en la sangre (Ghassemi *et al.*, 2014). En cambio, en temporada de verano la concentración de cortisol en ovejas se encuentra en 13.71 ng mL^{-1} , esto es 1.29 veces de aumento comparado con la temporada de invierno (Rathwa *et al.*, 2017).

El suministro de selenometionina (Se-Met) y/o cromo-metionina (Cr-Met) a corderas podría ser beneficiosa para atenuar efectos adversos debidos al estrés por transporte (Mousaie *et al.*, 2014). También Mousaie *et al.* (2014) estudiaron el efecto de Se-Cr-Met en cortisol y observaron menor concentración ($2.40 \mu\text{g dL}^{-1}$) en corderas alimentadas con Se-Cr-Met. Por otro lado, en vacas lecheras la adición de vitamina E y selenio, reduce el cortisol en sangre ($0.904 \mu\text{g dL}^{-1}$) y puede ser un método eficaz para minimizar la respuesta al estrés (Mudron y Rehage, 2018). La relativa estabilidad en los niveles de cortisol que se observaron en las ovejas en el presente estudio, puede deberse a que los animales se acostumbran al manejo cotidiano o a que el estrés por manejo de las ovejas en estudio no fue tan severo como podría serlo en otras explotaciones ovinas.

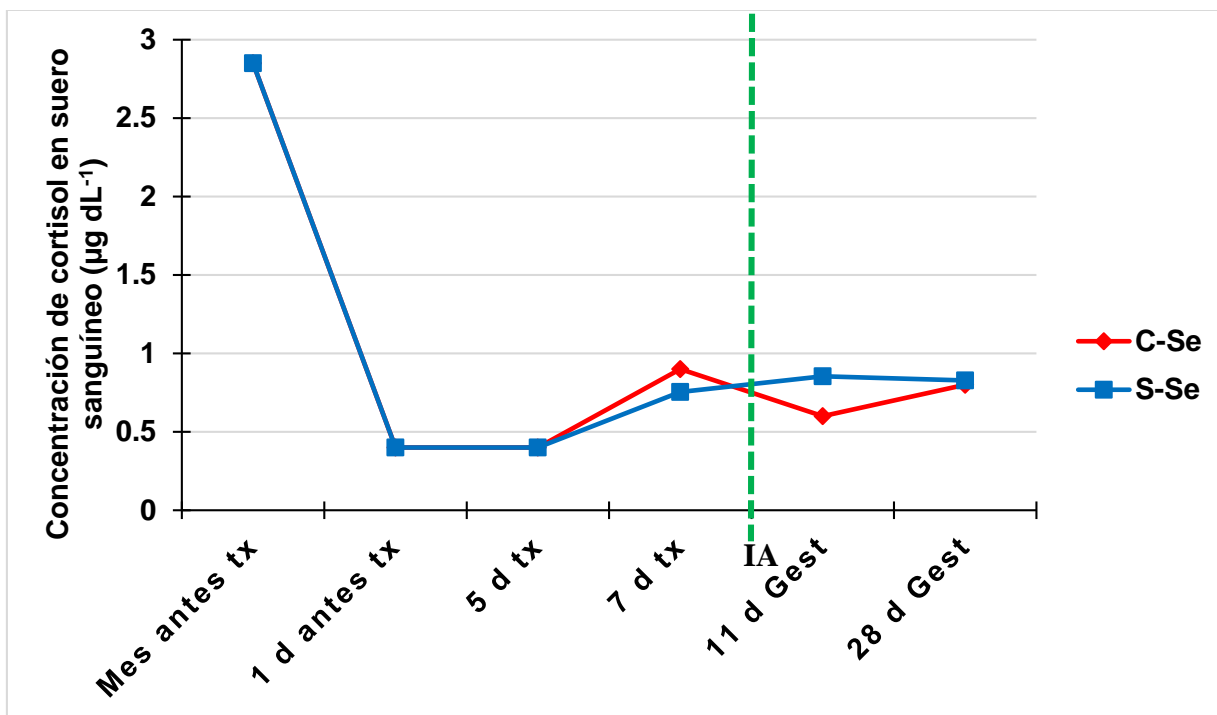


Figura 2. Concentración sérica de cortisol en ovejas gestantes a las que se les adicionó “selenio orgánico” en levadura.

S-Se= Testigo con selenio contenido en alimento ($0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$), C-Se= adición de selenio en levadura a dosis de $0.3 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ más $0.24 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de selenio contenido en el alimento; concentración final de $0.54 \text{ mg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Mes antes tx: un mes antes del inicio del tratamiento; 1d antes tx: 1 día antes del inicio del tratamiento; 5 y 7 d tx: días durante el tratamiento; d Gest: días de gestación, 11 y 23 contado a partir de un día después de la IA

En condiciones de estrés por calor en ovinos, se observa aumento en parámetros fisiológicos como TR, FR, FC y temperatura cutánea (TC) (Wojtas *et al.*, 2014; Rathwa *et al.*, 2017). También en condiciones de estrés calórico Tabarez *et al.* (2009) encontraron valores en temperatura rectal de 39.3 °C y frecuencia respiratoria de $89.6 \text{ latidos min}^{-1}$.

Con adición de “selenio orgánico” a las ovejas estudiadas en esta investigación no se produjeron cambios en: TR y FR durante la gestación; sin embargo, si se encontraron diferencias en la FC ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2). Lo anterior sugiere que el selenio puede ayudar al sistema circulatorio a mantenerse en equilibrio en la gestación.

Peña *et al.* (2012) reportan cambios en TR, FR y FC en diferentes épocas del año. En otro estudio, la suplementación con minerales y antioxidantes a ovejas no influyó en los parámetros fisiológicos evaluados por la mañana, sin embargo, sí se registró diferencia en FR y TR durante la tarde (Sejian *et al.*, 2013). Por otro lado, 1 mL de selenato de sodio inyectado (5 mg de selenio) a ovejas ocasionó que la TR fuera menor en las ovejas testigo (39.7 °C vs. 40.0 °C) a las 12:00 (Alhidary *et al.*, 2012). Chauhan *et al.* (2015) observaron menor frecuencia respiratoria (191 vs 232 respiraciones min^{-1}) y temperatura rectal (40.33 °C vs 40.58 °C) en ovejas que recibieron dieta alta en selenio y vitamina E que en aquellas alimentadas con dieta baja en selenio y vitamina E. Los estudios antes mencionados se hicieron con ovejas vacías, mientras, en el presente estudio se evaluaron en ovejas gestantes. En este contexto, son escasos los estudios del efecto del selenio en parámetros fisiológicos en animales gestantes y la relación que guardan con el estrés. Según Vicente-Pérez *et al.* (2019) en el último tercio de la gestación de ovejas bajo condiciones de estrés calórico, la temperatura rectal promedio encontrada fue de 39.6 °C; en tanto que en el presente estudio fue de 39 °C en ovejas S-Se y de 38.98 °C en ovejas C-Se.

Cuadro 2. Valores de los parámetros fisiológicos de ovejas a las que se les adicionó “selenio orgánico” en levadura.

Tiempo	Frecuencia Respiratoria		Frecuencia Cardíaca		Temperatura Rectal °C	
	S-Se	C-Se	S-Se	C-Se	S-Se	C-Se
	N					
	11	16	11	16	11	16
1 d antes tx.	66.36 _a	66.36 _a	137.32 _a	137.32 _a	39.18 _a	39.18 _a
5 d tx.	48.36 _b	50.75 _b	110.91 _a	108.00 _b	38.73 _{ab}	38.97 _{ab}
7 d tx.	49.45 _b	52.75 _b	116.36 _a	115.75 _b	39.09 _a	39.16 _a
11 d Gest.	52.36 _b	50.00 _b	110.18 _a	104.75 _b	39.08 _{ab}	39.07 _{ab}
28 d Gest.	45.82 _b	47.50 _b	114.55 _a	110.75 _b	38.88 _{ab}	38.86 _{ab}
42 d Gest.	49.45 _b	42.75 _b	114.55 _a	103.25 _b	38.74 _b	38.72 _b
63 d Gest.	53.09 _b	49.00 _b	103.64 _b	103.00 _b	38.95 _{ab}	38.81 _{ab}
78 d Gest.	47.59 _b	48.62 _b	119.20 _a	108.57 _b	38.76 _{ab}	38.94 _{ab}
92 d Gest.	46.79 _b	45.55 _b	126.80 _a	122.46 _{ab}	39.13 _{ab}	39.04 _{ab}
104 d Gest.	48.79 _b	43.39 _b	129.60 _a	120.92 _{ab}	39.04 _{ab}	39.14 _{ab}
124 d Gest.	50.79 _b	52.93 _b	118.00 _a	117.54 _b	38.92 _{ab}	38.91 _{ab}
140 d Gest.	51.94 _b	49.45 _b	132.00 _a	120.36 _{ab}	39.25 _a	39.05 _a
Media	50.64	48.95	115.95 _x	112.28 _y	39.00	38.98
P-value						
Tratamiento	0.0691		0.0485		0.6097	
Tiempo	<.0001		<.0001		0.0004	
Trat*Tiempo	0.3513		0.5487		0.4001	

S-Se= Testigo con selenio contenido en alimento (0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹), C-Se= adición de selenio en levadura a dosis de 0.3 mg animal⁻¹ día⁻¹ más 0.24 mg animal⁻¹ día⁻¹ de selenio contenido en el alimento; concentración final de 0.54 mg l animal⁻¹ día⁻¹. 1 d antes tx: 1 día antes del inicio del tratamiento; 5, 7 d tx: días durante el tratamiento; d Gest: días de gestación. a, b = literales diferentes en la misma columna indican diferencias ($P \leq 0.05$).

3.5 CONCLUSIONES

La adición de “selenio orgánico” antes de la IA afecta la concentración del mineral en la sangre durante la gestación. Se encontró menor concentración de selenio en suero sanguíneo en ovejas C-Se en el día nueve de gestación.

La adición de “selenio orgánico”, disminuye la frecuencia cardiaca y no altera los demás parámetros fisiológicos ni la concentración de cortisol (indicadores de estrés), ante el estrés producido por manejo cotidiano en ovejas durante todo el desarrollo pre-gestacional y gestacional.

3.6 LITERATURA CITADA

- Alhidary I. A., S. Shini., R. A. M. Al Jassim., A. M. Abudabos., and J. B. Gaughan. 2015. Effects of selenium and vitamin E on performance, physiological response, and selenium balance in heat-stressed sheep *Journal of Animal Science*. 93(2): 576-588.
- Alhidary I. A., S. Shini., R. A. M. Al Jassim., and J. B. Gaughan. 2012. Effect of various doses of injected selenium on performance and physiological responses of sheep to heat load1. *Journal of Animal Science*, 90(9): 2988-2994.
- Carlson D. B., J. J. Reed., P. P. Borowicz., J. B. Taylor., L. P. Reynolds., T. L. Neville., D. A. Redmer., K. A. Vonnahme., and J. S. Caton. 2009. Effects of dietary selenium supply and timing of nutrient restriction during gestation on maternal growth and body composition of pregnant adolescent ewes. *Journal of animal science*. 87(2): 669-80.
- Chauhan S. S., P. Celi., B. J. Leury., and F. R. Dunshea. 2015. High dietary selenium and vitamin E supplementation ameliorates the impacts of heat load on oxidative status and acid-base balance in sheep. *Journal of Animal Science*. 93: 3342-3354.
- Dobson H., C Fergani., J.E Routly., and R.F Smith. 2012. Effects of stress on reproduction in ewes. *Animal Reproduction Science*. 130(3-4): 135-40.
- Erdoğan S., F. Karadaş., A. Yılmaz., and K. Serhat. 2017. The effect of organic selenium in feeding of ewes in late pregnancy on selenium transfer to progeny. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 46(2): 147-155.
- Ghassemi N. J., J. D. Lohakare., J. K. Son., E. G. Kwon., J. W. West., and K. I. Sung. 2014. Wool cortisol is a better indicator of stress than blood cortisol in ewes exposed to heat stress and water restriction. *Animal*. 8(1): 128-132.

- Hall J. A., R. J. Van Saun., G. Bobe., W. C. Stewart., W. R. Vorachek., W. D. Mosher., T. Nichols., N. E. Forsberg., and G. J. Pirelli. 2012. Organic and inorganic selenium: I. Oral bioavailability in ewes. *Journal of Animal Science*, 90(2): 568-576.
- Hefnawy A. E., S. Youssef, P. Villalobos A., C. Valverde R., and J. L. Tórtora P. 2014. The relationship between selenium and T3 in selenium supplemented and nonsupplemented ewes and their lambs. *Veterinary Medicine International*. 2014: 105236.
- Inafed. 2018. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Disponible: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15028a.html>.
- Indu S., and A. Pareek. 2015. A Review: Growth and Physiological Adaptability of Sheep to Heat Stress under Semi-Arid Environment. *International Journal of Emerging Trends in Science and Technology*. 2(9): 3188-3198.
- Mousaei A., R. Valizadeh., A. A. Naserian., M. Heidarpour., and H. K. Mehrjerdi. 2014. Impacts of feeding selenium-methionine and chromium-methionine on performance, serum components, antioxidant status, and physiological responses to transportation stress of Baluchi ewe lambs. *Biological trace element research*. 162: 113-123.
- Mudron P., and J. Rehage. 2018. Effects of vitamin E and selenium supplementation on blood lipid peroxidation and cortisol concentration in dairy cows undergoing omentopexy. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(4): 837-842.
- Pappas A. C., E. Zoidis., and S. E. Chadio. 2019. Maternal Selenium and Developmental Programming. *Antioxidants (Basel)*. 8(5): 145.
- Parraguirre A. E., L. Miranda J., y J. Herrera H. 2015. Complemento con selenometionina a ovejas gestantes y efecto el desarrollo de sus corderos. *Agroproductividad*. 8(6): 52-58.
- Peña, S., G. López., E. Genero., N. Abbiati., y R. Martínez. 2012. Variables fisiológicas en hembras ovinas criollas y Texel. *Veterinaria Argentina*. 29(290): 1-9.
- Pieczynska J., and H. Grajeta. 2015. The role of selenium in human conception and pregnancy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 29: 31-38.
- Rathwa S. D., A. A. Vasava., M. M. Pathan., S. P. Madhira., Y. G. Patel., and A. M. Pande. 2017. Effect of season on physiological, biochemical, hormonal, and oxidative stress parameters of indigenous sheep. *Veterinary world*. 10(6): 650-654.
- Romo-Barron C. B., D. Diaz., J. J. Portillo-Loera., J. A. Romo-Rubio., F. Jiménez-Trejo., and A. Montero-Pardo. 2019. Impact of heat stress on the reproductive performance and physiology of ewes: a systematic review and meta-analyses. *International Journal of Biometeorology*. 63(7): 949-962.
- SAS. 2002. Versión 9.0 for Windows edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

- Sejian V., V. P. Maurya., and S. M. Naqvi. 2010. Adaptability and growth of Malpura ewes subjected to thermal and nutritional stress. *Tropical Animal Health and Production* 42: 1763-1770.
- Sejian, V., A. K. Singh., A. Sahoo., and S. M. K. Naqvi. 2013. Effect of mineral mixture and antioxidant supplementation on growth, reproductive performance and adaptive capability of Malpura ewes subjected to heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 98(1): 72-83.
- Silveira R. M. F., B. E. Silva B., A. M. Vasconcelos., D. A. Façanha E., T. P. Martins., M. C. Rogério., and J. Ferreira. 2019. Does organic selenium supplement affect the thermoregulatory responses of dairy goats? *Biological Rhythm Research*. 13: 102-108.
- Stewart W. C., G. Bobe., W. R. Vorachek., G. J. Pirelli., W. D. Mosher., T. Nichols., R. J. Van Saun., N. E. Forsberg., and J. A. Hall. 2012. Organic and inorganic selenium: II. Transfer efficiency from ewes to lambs. *Journal of Animal Science*. 90(2): 577-584.
- Tabarez A. R., A. Porras A., H. Vaquera H., J. Hernández I., J Valencia., S. Rojas M., y J. Hernández C. 2009. Desarrollo embrionario en ovejas pelibuey y suffolk en condiciones de estrés calórico. *Agrociencia*. 43(7): 671-679.
- Tinggi U. 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental health and preventive medicine*. 13(2): 102-108.
- Van Lier E., R. Pérez., and M. Forsberg. 2003. Sex differences in cortisol secretion after administration of an ACTH analogue in sheep during the breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*. 79: 81-92.
- Vicente- Pérez R., U. Macías-Cruz., L. Avendaño-Reyes, A. Correa-Calderón., C. Luna-Palomera., y A. Chay-Canul. 2019. Relación de temperatura rectal y frecuencia respiratoria con temperaturas de pelo obtenidas por termografía en ovejas gestantes estresadas por calor. *Información técnica económica agraria*. 115: 219-230.
- Wojtas K., P. Cwynar., and R. Kolacz. 2014. Effect of thermal stress on physiological and blood parameters in merino sheep. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 58: 283-288.

CAPÍTULO IV. EFECTO DEL SELENIO (SELENOMETIONINA) SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y VÍAS ASOCIADAS A LA INMUNIDAD EN FOLÍCULOS *IN VITRO* DE OVEJAS

4.1 RESUMEN

Antecedentes: El selenio es un oligoelemento esencial en la fisiología del animal, ayuda en las funciones inmunitarias, activa las células asesinas naturales, entre otras células inmunes innatas. A nivel reproductivo, influye en la expresión génica durante la maduración del ovocito y beneficia la formación y calidad de los blastocitos. En ovejas se ha investigado el efecto del selenio sobre la expresión génica. El conocimiento sobre el efecto del selenio en el sistema inmunológico de las ovejas a nivel de expresión génica, molecular y celular, es escaso. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del selenio (selenometionina) en el tejido folicular *in vitro* de ovejas e identificar genes relacionados con el sistema inmunológico con base en la comparación de dos tratamientos contrastantes en un microarreglo (heterólogo) de 22K genes.

Resultados: Se identificaron 2538 genes con expresión diferencial (DEGS), de ellos, 1228 fueron genes sobre-regulados y 1310 fueron genes sub-regulados. Estos genes se clasificaron en 32 grupos relacionados con procesos biológicos, 18 con componentes celulares y 12 con funciones moleculares con base en anotación de ontología de genes ($P \leq 0.01$). Los DEGS se asignaron a 41 vías mediante análisis de vías metabólicas y señalización KEGG ($P \leq 0.05$); de ellos, 94 genes quedaron involucrados en ocho vías asociadas a procesos relacionados con el sistema inmunológico. De los genes asociados, 48 genes estuvieron sobre-regulados y 46 genes sub-regulados, destacando los genes *CD8A*, *CD48*, *NFATC2*.

Conclusiones: La exposición de folículos pre-ovulatorios a selenometionina (10 ng mL⁻¹) indujo la expresión diferencial de genes, algunos de ellos, relacionados con el sistema inmunológico e involucrados en diferentes vías, funciones y procesos biológicos. Se corroboró *in vitro*, la acción del selenio en la calidad del sistema inmunológico innato y adaptativo de folículos, requisito importante para la maduración de los ovocitos, la fertilización y el desarrollo embrionario.

Palabras clave: Genes, Microarreglos, Selenio, Ovejas, Inmunidad, Folículos.

4.2 INTRODUCCIÓN

Actualmente, es importante diseñar métodos mejorados para manipular la reproducción y producción en animales domésticos. Por tanto, es necesario comprender el proceso biológico y genético de los diferentes sistemas del organismo animal, como el sistema inmunológico. También, es fundamental el estado de los folículos que serán ovulados y de ovocitos sanos, para el futuro desarrollo embrionario y el rendimiento reproductivo de las hembras. Algunos oligoelementos como el selenio desempeñan un papel importante en el funcionamiento reproductivo y productivo. El selenio como oligoelemento esencial ejerce funciones cruciales en la salud animal y humana [1,2]; influye en la regulación de la respuesta inmune y funciones reproductivas [1-5]. El selenio también tiene efecto sobre funciones estructurales, enzimáticas, catalíticas y antioxidantes al ser componente de las selenoproteínas [1]. A nivel reproductivo, el selenio es importante en la proliferación y en la esteroidogénesis [6], participa en el desarrollo del folículo y la ovogénesis [7]. Las funciones fisiológicas del selenio están mediadas por selenoproteínas [8].

La suplementación con selenio influye en la expresión génica durante la maduración del ovocito de yak (bovino nativo de Asia Central) y beneficia la formación y la calidad de los blastocistos [9]. Mientras que, en ratones viejos, la suplementación con selenio, (inorgánico o/y orgánico), puede mejorar el potencial de desarrollo de los embriones resultantes de los ovocitos de vesículas germinales *in vitro* [10].

Respecto al efecto de la suplementación con selenio en la regulación y cambios de la expresión génica se ha estudiado en roedores, cerdos, pollos de engorda y en humanos; no obstante, hay pocos informes en rumiantes. En los últimos años se han realizado algunos estudios en ovejas [11-15] donde se investigó el efecto de una dieta alta en selenio, sobre los niveles del ARNm de genes relacionados con la inmunidad, proteínas de choque térmico del musculo esquelético y genes del metabolismo de los lípidos. Sin embargo, se conocen pocos estudios [7, 12, 16] sobre el efecto del selenio en el sistema inmunológico de las ovejas a nivel folicular.

El sistema inmunológico tiene dos tipos de respuesta: innato y adaptativo. El contenido de selenio en el organismo puede afectar la función inmune tanto adaptativa como innata [17]. Como inmunoestimulador, el selenio media la inflamación y la inmunidad, influye en los procesos de proliferación de las células T, interviene en la actividad de las células asesinas naturales (NK) y en otras funciones de las células inmunitarias innatas [18].

En la inmunidad adaptativa, aquella que se produce en respuesta a antígenos específicos, el consumo de selenio influye en la activación y funciones de las células T y B. Niveles altos de selenio *in vivo* tienen efecto positivo sobre la proliferación y diferenciación de las células T-auxiliares (Th) del grupo de diferenciación (CD) 4⁺ [19]. Su función a este nivel parece ser

redox e influir en la epigenética de la diferenciación hacia un fenotipo particular mediante el acoplamiento del TCR (Receptor de células T), es decir, el Se influye en la diferenciación de las células T-auxiliares [18].

A la fecha, se dispone de poca información sobre los efectos del selenio en células T citotóxicas CD8⁺, del antígeno *CD48*, así como, del factor nuclear de células T activadas dependiente de calcineurina 2 (*NFATC2*). En ovejas, la información sobre estas células y el gen en mención es aún más escasa.

El gen *CD48* es un miembro de la familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización, participa en la adhesión y activación de las células inmunes [20], dada su importancia, actualmente, *CD48* se está estudiando como un nuevo mecanismo de contraataque viral para subvertir la vigilancia inmunitaria [21].

Hasta ahora, se han realizado pocas investigaciones para comprender el papel del selenio en los folículos *in vitro* de ovejas, específicamente, sobre la activación o represión de la expresión génica vinculada al sistema inmunológico del ovario. Por tanto, los objetivos de este estudio fueron investigar el efecto del selenio (selenometionina) en tejido folicular *in vitro* de ovejas, detectar cambios en la expresión de genes e identificar genes relacionados con el sistema inmunológico.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron ovarios de 10 ovejas adultas de razas mixtas en un matadero local. Inmediatamente post mórtem (1 h), los ovarios fueron transportados al laboratorio y colocados en solución salina (cloruro de sodio al 0.9 %) con antibiótico (0.01 mg mL⁻¹

gentamicina) a 4 °C. El tejido adiposo y los ligamentos circundantes se eliminaron y se dieron dos lavados con la misma solución hasta que los ovarios quedaron limpios. Los folículos se visualizaron con un microscopio estereoscópico (ZEISS; 475022) y se midió el diámetro folicular con un vernier. Los folículos pre-ovulatorios (diámetro ≥ 6 mm) se extrajeron de los ovarios, utilizando bisturí y pinzas de disección en condiciones estériles. Los folículos se mantuvieron en una solución compuesta por medio esencial (MEM) (Sigma-Aldrich), solución salina y antibiótico (0.01 mg mL⁻¹ de gentamicina), previo a su cultivo *in vitro*.

Cultivo *in vitro*

El diseño experimental incluyó dos tratamientos y 6 repeticiones; se seleccionaron 36 folículos pre-ovulatorios, se colocaron 3 folículos en tubos tipo Eppendorf con 1 mL de medio de cultivo, en total fueron 18 folículos elegidos al azar por tratamiento. El tratamiento testigo consistió en MEM con 100 UI mL⁻¹ de gonadotropina coriónica equina (eCG) y gentamicina al 0.01 % mientras que, para estudiar el efecto del selenio, al medio se le adicionaron 10 ng mL⁻¹ de selenometionina. Los tratamientos se incubaron durante 24 h con base en lo descrito por Miranda *et al.* [22]. Posteriormente, los folículos se retiraron del medio de cultivo y se colocaron en tubos tipo Eppendorf de 2 mL, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción del ARN.

Extracción de ARN

El ARN total de los folículos se extrajo utilizando TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se evaluó cuantitativa y cualitativamente mediante absorbancia utilizando un espectrofotómetro ND-2000 NanoDrop (NanoDrop, Thermo Scientific) y geles desnaturalizantes de agarosa al 1.5 % con base en el protocolo de

Sambrook y Russell [23], respectivamente. Las muestras de ARN se procesaron en la Unidad de Microarreglos de ADN de la Universidad Nacional Autónoma de México (<http://microarrays.ifc.unam.mx/>) utilizando tinción fluorescente Cy3-dUTP y Cy5-dUTP y un microarreglo heterólogo de 22K genes de ratón.

Análisis de enriquecimiento funcional

Los valores de fluorescencia entre Cy3 y Cy5 se normalizaron y aquellos con z-score ≥ -1.5 y ≥ 1.5 se consideraron como genes con expresión diferencial (DEGS). Esos DEGS se utilizaron para la anotación a los términos de Gene Ontology (GO) con $P \leq 0.01$ y $P \leq 0.05$ [24] y a la base de datos enciclopedia kyoto para genes y genomas (KEGG) de vías metabólicas y señalización con $P \leq 0.05$ [25] a través de DAVID Bioinformatics Resources v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>). La visualización de la interacción génica de las vías se hizo con el software Cytoscape v3.7.2 [26].

Validación cuantitativa de qPCR en tiempo real

Se seleccionaron tres DEGS (*CD8A*, *CD48*, *NFATC2*) implicados en vías de señalización inmunológicas para validar su expresión relativa mediante RT-qPCR. La amplificación se hizo con cebadores diseñados con base en CDS de ovino de genes reportados en el GenBank y el software Primer 3 (Tabla 1). El análisis de RT-qPCR se desarrolló en la Unidad de Servicios Genómicos (LANGEBIO-CINVESTAV, México) utilizando tres repeticiones técnicas. Se utilizó el gen β -actina (*ACTB*) como control endógeno y el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para cuantificar la expresión relativa de los genes seleccionados entre los dos tratamientos experimentales.

Cuadro 1. Cebadores utilizados para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Gen	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño (pb)	Número de acceso GenBank
<i>ACTB</i>	F:CATCGGCAATGAGCGGTTCC	146	NM_001009784
	R:CCGTGTTGGCGTAGAGGT		
<i>CD8A</i>	F:GGAGTGAACCTGAACCCTGGA	225	XM_027966754
	R:TGACCCAGGAGCATGTTTGA		
<i>NFATC2</i>	F:CCACTTTTCTCCAACAGCCC	193	XM_027977331
	R:GAACCCACCCACTGAAACAC		
<i>CD48</i>	F:GCTTGGCATCCTTCTCATGG	250	XM_012183742
	R:GCCCTTCTCCGAGTCTTTCT		

ACTB gen constitutivo.

4.4 RESULTADOS

Se identificaron 2538 genes que mostraron diferencias significativas ($z\text{-score} \geq -1.5$ y ≥ 1.5) después de comparar la intensidad de hibridación entre folículos sin exposición a selenio y folículos expuestos a selenio. Del total, 1228 genes fueron sobre-regulados y 1310 genes sub-regulados y estos fueron los que se utilizaron en los análisis de anotaciones funcionales posteriores.

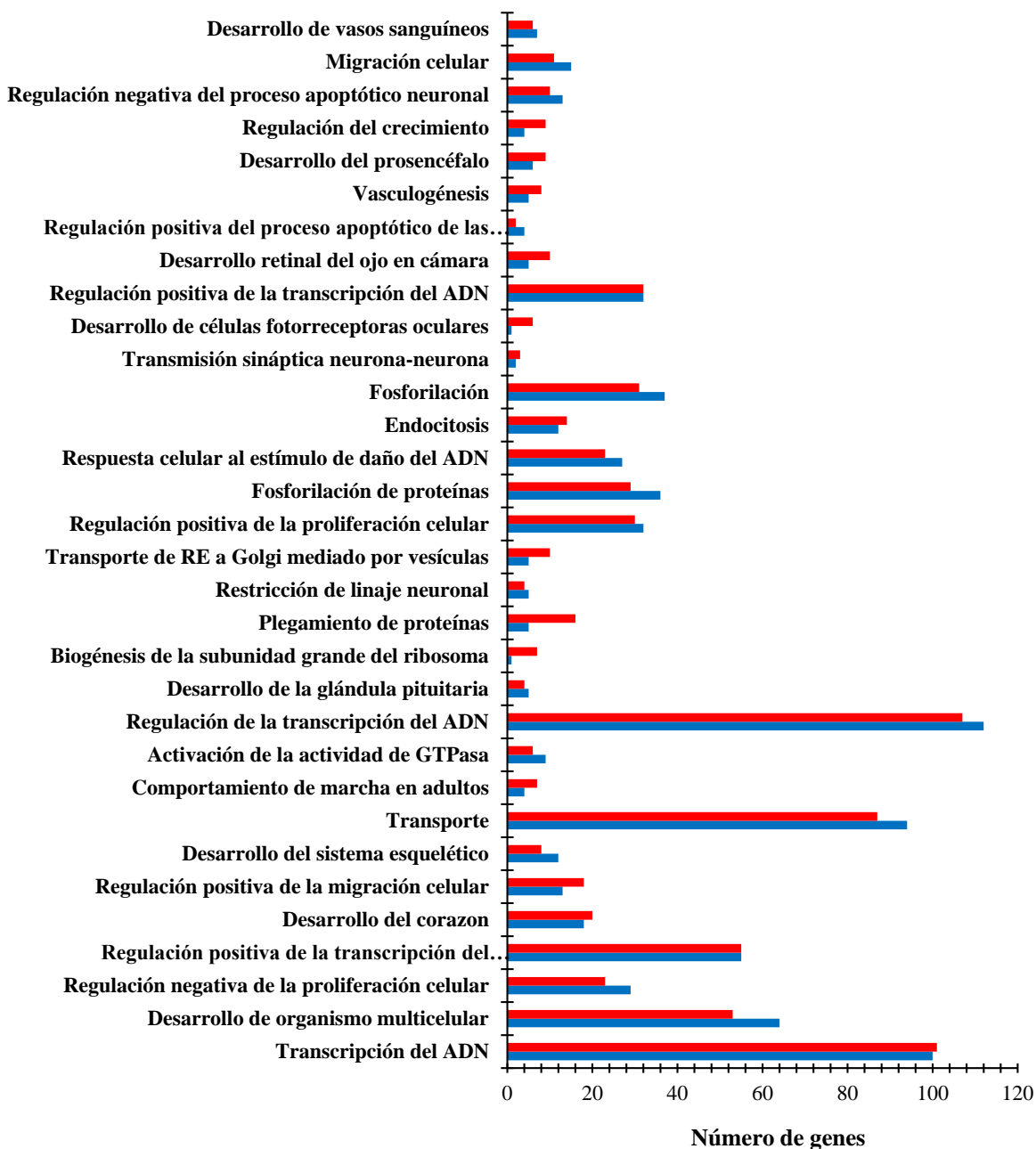
Análisis de anotación GO y enriquecimiento KEGG de DEGS

Se analizaron en total 1411 genes elegibles por DAVID mediante análisis GO ($P \leq 0.01$); estos fueron clasificados en 32 grupos funcionales vinculados a procesos biológicos (PB), 18 grupos a componentes celulares (CC) y 12 grupos a funciones moleculares (FM). Según el análisis de GO, la mayor abundancia de genes estuvo dentro de la categoría PB. Para genes sobre-regulados, los grupos implicados en PB involucraron procesos de transcripción, regulación positiva de migración celular, plegamiento de proteínas, endocitosis; en tanto que aquellos relacionados con CC incluyeron citoplasma y núcleo, y aquellos involucrados con FM correspondieron a proteínas de unión al ADN. Para los genes sub-regulados, los PB implicaron procesos de transcripción, transporte y fosforilación; los CC, membrana y citoplasma, y los FM, proteínas y nucleótidos de unión (Fig. 1).

En el análisis de GO ($P \leq 0.05$) fueron clasificados 115 grupos funcionales de PB, 42 grupos CC y 38 grupos FM. De manera importante, se identificaron mediante los términos de GO, genes relacionados con procesos inmunes (Cuadro 2) que pueden estar desempeñando un papel importante en la regulación del sistema inmunológico en los folículos pre-ovulatorios de ovejas. En el conjunto de genes asociados a PB destacaron genes sobre-regulados relacionados con endocitosis ($P \leq 0.01$).

Procesos Biológicos

A



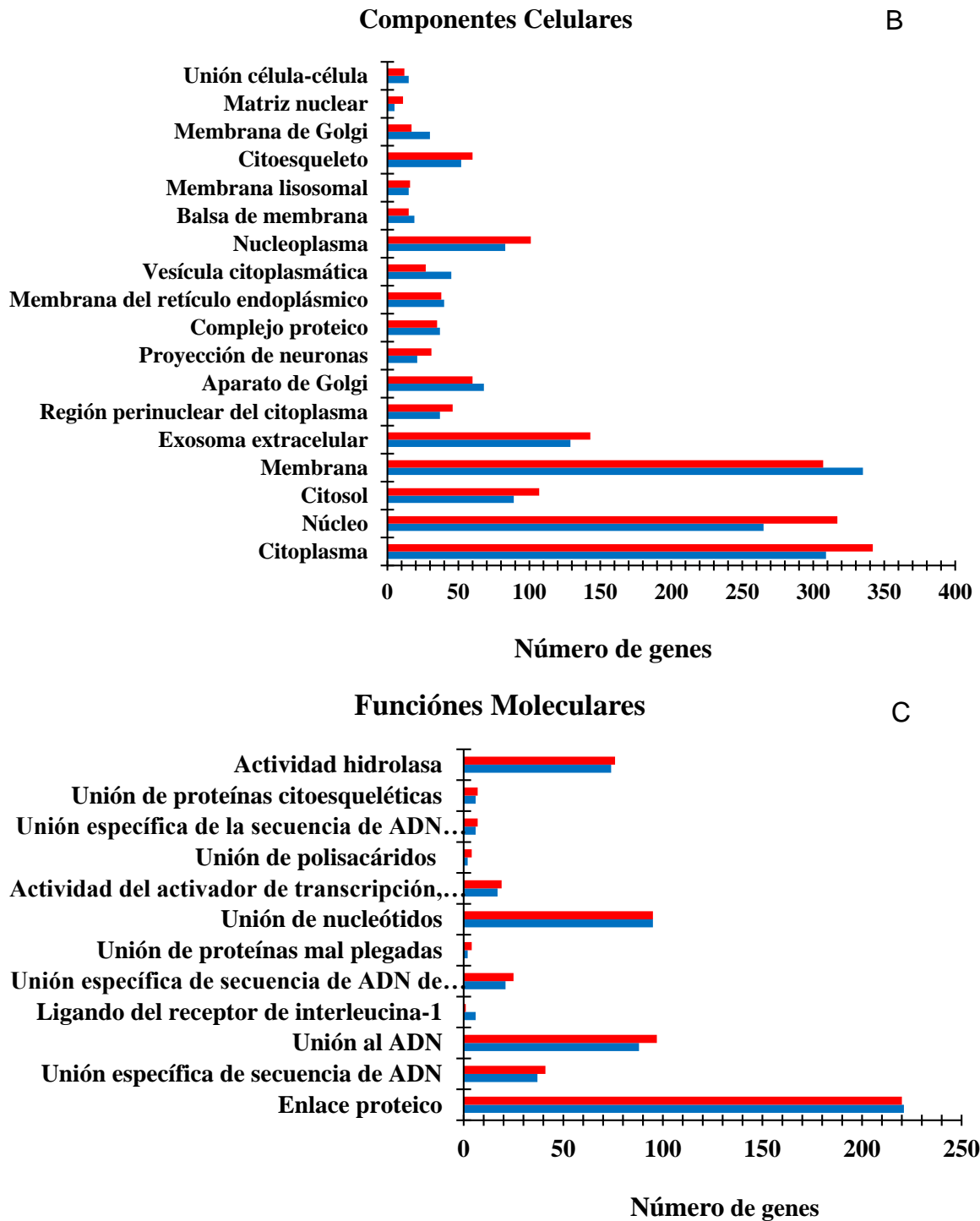


Fig. 1 Clasificación de Ontología de Genes (GO) de genes expresados diferencialmente por efecto de selenometionina en folículos *in vitro* de ovejas (1411 genes, $P \leq 0.01$). (A) Procesos biológicos; (B) Componente celular y (C) Función molecular. Rojo (sobre-regulado) y azul (sub-regulado).

Cuadro 2. Diez procesos biológicos principales relacionados con el sistema inmunológico de folículos *in vitro* expuestos a selenometionina.

Categoría	Cantidad	Sobre-regulado	Sub-regulado	Fold Enrichment	P-Value
GO:0006897~endocitosis.	26	<i>CD209B, RAB1A, ARHGAP27, AP2M1, APP, ARR3, EPS15, PIK3CB, PSTPIP1, PACSIN1, PACSIN3, SORT1, SNX1, SNX4</i>	<i>ATP9A, CD209B, GAPVD1, HRAS, RAB34, ARHGAP27, WIPF2, ARC, AP2M1, APP, ARR3, A4</i>	1.80	0.0048
GO:2000353~ regulación positiva del proceso apoptótico de las células endoteliales.	6	<i>FOXO3, AGER</i>	<i>AKR1C18, COL18A1, PRKCI, RGCC</i>	4.71	0.0066
GO:0043524~ regulación negativa del proceso apoptótico neuronal.	23	<i>ISL1, JAK2, KRAS, CACNA1A, MTNR1B, MT1, NGF, NRBP2, SOD1, UBE2V2</i>	<i>BTG2, HRAS, CORO1A, EN1, FOXB1, FZD9, HSPD1, HIPK2, LGMN, MDK, NPM1, PRKCI, SIX4</i>	1.80	0.0083
GO:0043065~ regulación positiva del proceso apoptótico.	40	<i>JAK2, SOX4, B4GALT1, WT1, AIFM1, AGER, CASP1, CTNNB1, CCAR1, DAPK3, EEF1E1, FOXO3, MSX2, NGF, NET1, PTEN, ZAK, TOP2A</i>	<i>CLIP3, RBCK1, APBB2, CTNBL1, CLU, DHODH, HSPD1, HMGA2, ING5, IP6K2, IL24, MUC2, LPAR1, NTRK3,</i>	1.50	0.0108

					<i>KCNMA1, SFRP1, SAV1, STK4, TEX261, TFAP4, TGFB1</i>
GO:0010667~ regulación negativa del proceso apoptótico de las células del músculo cardíaco.	7	<i>PCMT1, QK, JAK2, HSF1, NFE2L2</i>	<i>GHRH, NPM1</i>	3.38	0.0145
GO:0006909~fagocitosis	10	<i>ANXA3, MEGF10, TULP1, TUSC2</i>	<i>GATA2, CORO1A, EIF2AK1, HCK, ABL2, VAV1</i>	2.41	0.0205
GO:0043066~ regulación negativa del proceso apoptótico.	59	<i>ARF4, ARAF, BCL11B, CD38, CD74, HHIP, JAK2, ARHGAP10, SMARCA4, TRIAP1, WT1, AIPL1, AVEN, CRYAB, CBS, TEK, EPCAM, FXN, GAS1, MAEA, MSX2, PROPI, PRDX5, PTEN, PLAC8, PLK1, RHBDD1, SLC40A1, SPHK1, SOD1, TEX11, ZFP830</i>	<i>OGG1, BTG2, LIMS1, PTK2, STIL, ALB, AKR1B3, APBB2, ARNT2, BFAR, CLU, DPEP1, GNAQ, HSPD1, HELLS, HCK, HMGA2, IL24, LTK, NPM1, PAX4, KCNJ1, PRKAA2, SFRP1, SIX4, SPHK2, UCP2</i>	1.31	0.0286

GO:0038096~ Vía de señalización del receptor Fc-gamma implicada en la fagocitosis.	3		<i>WAS, WASL, CDC42</i>	9.41	0.0341
GO:0042110~activación de células T.	7	<i>CD48, CD8A</i>	<i>WAS, HSPD1, ITGAV, TGFB1, VAV1</i>	2.58	0.0495
GO:0030097~hematopoyesis.	13	<i>CD34, TIPARP, ADD2, CTNNB1, TEK, GF11</i>	<i>GATA2, BRCA2, CUL4A, KIRREL3, PICALM, RUNX1, SFRP1</i>	1.90	0.0395

Respecto a vías metabólicas y de señalización, el análisis con la KEGG asignó los DEGS ($P \leq 0.05$) a 41 vías (Fig. 2); de éstas, ocho vías están involucradas en procesos inmunes: vía de citotoxicidad mediada por células asesinas naturales, vía de señalización de Wnt, vía de señalización del receptor de células B, vía de señalización del receptor de células T, vía de migración transendotelial de leucocitos, vía de señalización MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) regulación del mediador inflamatorio de los canales TRP (Receptores de Potencial Transitorio) y fagocitosis mediada por Fc (Fragmento cristalizante) gamma R. Estos resultados indican que los genes expresados diferencialmente en folículos tratados con selenometionina están involucrados en el sistema inmunológico. Asimismo, se encontraron algunas vías asociadas a enfermedades inmunes y enfermedades infecciosas, como artritis reumatoide, influenza A, además de procesos de transducción de señales, procesamiento de información genética y cáncer. Entre los 1411 genes, 58 están involucrados en la vía KEGG más grande en cáncer y 30 genes en la vía de señalización MAPK, entre otras vías importantes (Fig.2).



Fig. 2 Análisis de la vía Enciclopedia de Kioto para genes y genomas (KEGG) de genes expresados diferencialmente presentes como efecto de la selenometionina en folículos *in vitro* de ovejas.

Análisis de la red de interacción de genes de expresión

La red de expresión se construyó utilizando 94 genes y ocho vías biológicas importantes relacionadas con el sistema inmunológico. De éstos, 48 fueron sobre-regulados y 46 sub-regulados. Como se muestra en la Fig. 3, algunos DEGS estaban en el centro de la red, como *PIK3CD*, *WNT8A*, *CACNA1*, *VAV2*, *CD48*, *CD8A*, *NFATC2*, lo que indica interacción-regulación mutua en vías del sistema inmunológico. Quince genes, incluidos *CD8A*, *NFATC2*, se asignaron en la vía de señalización del receptor de células T; de ellos, nueve genes estuvieron siendo sobre-regulados y seis genes sub-regulados. Además, 20 genes se asignaron en las rutas de migración transendotelial de leucocitos.

Validación cuantitativa de qPCR en tiempo real

Los cambios de expresión relativa de tres genes relacionados con la inmunidad (*CD8A*, *CD48*, *NFATC2*) se confirmó mediante RT-qPCR y se compararon con las mismas muestras analizadas por microarreglos (Fig. 4). Se encontró variación de la cantidad detectada de los genes seleccionados entre ambos tratamientos experimentales. Estos genes muestran cambios de expresión diferencial en microarreglos, pero no se encontró la misma cantidad mediante RT-qPCR lo que puede estar relacionado con problemas específicos de secuencia y selección de cebadores, diseño del cebador y otras condiciones experimentales.

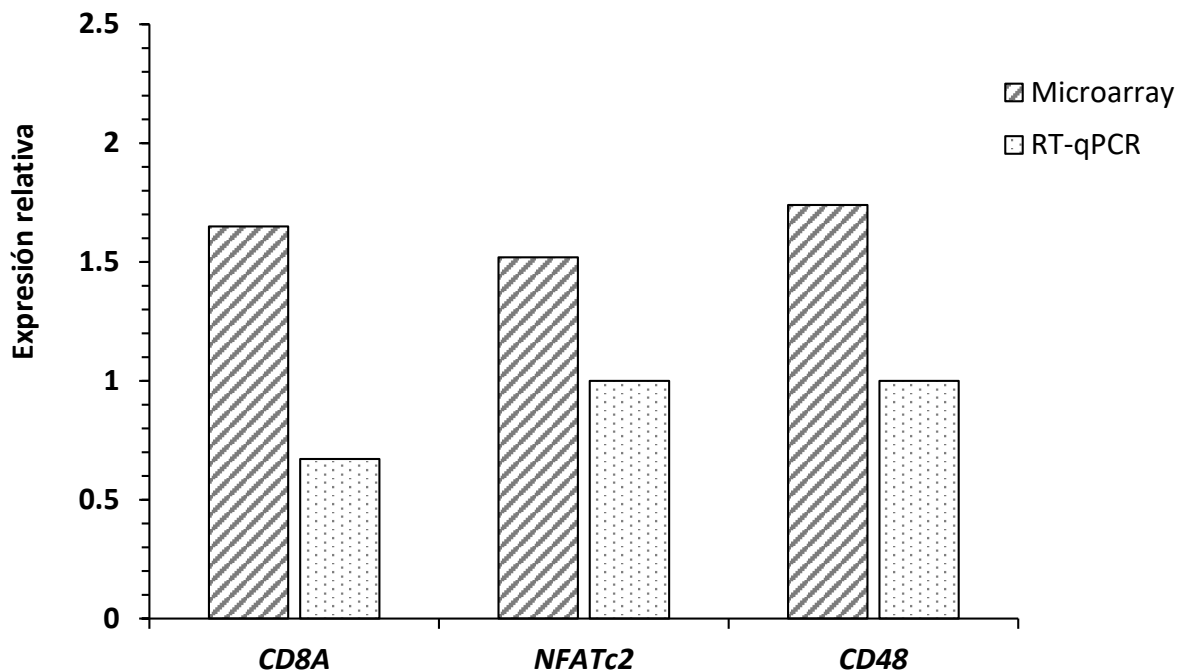


Fig. 4 Tres genes validados por RT-qPCR de folículos *in vitro* de ovejas por efecto de selenometionina. *CD8A*: Cluster de diferenciación 8 α , *NFATC2*: Factor nuclear de linfocitos T activados, 2- dependientes de calcineurina y *CD48*: Cluster de diferenciación 48.

4.5 DISCUSIÓN

En este estudio, se identificaron 2538 genes con cambios en su expresión, lo cual sugiere que el selenio aún suplementado *in vitro* a los folículos (10 ng mL⁻¹), tiene efectos sobre el transcriptoma. Estos resultados concuerdan con lo observado en ovejas suplementadas con alta concentración de “selenio orgánico” (0.40 mg) donde detectaron 1186 transcritos expresados [16] y en gansos bajo estimulación de selenio; se identificaron 2228 genes expresados diferencialmente [27]. El tratamiento con selenio a los folículos de ovejas también permitió diferenciar 1228 genes sobre-regulados y 1310 genes sub-regulados. En contraste, con lo observado en ovejas

suplementadas con dosis altas de “selenio orgánico” donde encontraron 942 y 244 genes sobre-regulados y sub-regulados, respectivamente [16]; en gansos con selenito identificaron 1157 genes sobre-regulados y 1071 genes sub-regulados [27], y en ratas con dietas normales y bajas de selenio detectaron 2514 genes sobre-regulados y 2417 genes sub-regulados [28]; como se observa encontraron mayor número de genes sobre-regulados y menor número de sub-regulados.

Según la clasificación de GO, la mayor abundancia de genes se representó en la categoría de PB, principalmente aquellos involucrados en la transcripción (Fig. 2A); mientras que en CC y FM, el citoplasma y los nucleótidos de unión fueron los componentes que destacaron, lo cual concuerda con otros estudios en ovejas [16], en gansos [27] y en ratas [28] cuando suplementaron selenio a niveles altos. El nivel de selenio en la dieta altera la lectura del código genético y regula la expresión de los genes específicos de selenoproteínas mediante la regulación diferencial del codón UGA y el control del paso limitante de la incorporación de selenocisteína (Sec). Además, aumenta la densidad de ribosomas río abajo de los codones UGA que codifican a la selenocisteína [29]. Estudios sugieren que existe efecto de modulación de la transcripción inducido por selenio [30].

En este estudio, el análisis funcional reveló una semejanza entre genes sobre-regulados (48 genes) y sub-regulados (46 genes), involucrados en ocho vías principales relacionadas con el sistema inmunológico. Estos resultados coinciden a lo observado en leucocitos de cerdos suplementados con selenio, en donde se encontraron 28 genes sobre-regulados y 24 genes sub-regulados [31]. Asimismo, en un estudio en ratas con niveles bajos y normales de selenio se detectaron 44 vías con valor de $P \leq 0.05$, en las cuales se encuentran la vía de señalización de Wnt, la de migración transendotelial de leucocitos, entre otras vías [28].

El análisis diferencial permitió detectar genes sobre-regulados y sub-regulados en folículos pre-ovulatorios de ovejas cultivados *in vitro*, involucrados en el sistema inmunológico. Estos hallazgos sugieren que es posible que el selenio en los folículos pre-ovulatorios, afecte la expresión de genes y vías de señalización relacionadas con el proceso inmunológico en los folículos pre-ovulatorios; además, podría regular el crecimiento del folículo pre-ovulatorio y la maduración de los ovocitos al igual que su protección. En un estudio reciente en ratones [10], se demostró que la suplementación con selenio mejoró significativamente el mantenimiento de los folículos y redujo la tasa de apoptosis en los ovarios; asimismo, aumentó la capacidad proliferativa de las células de la granulosa luteinizadas [6].

Los resultados en este estudio mostraron la activación de algunos genes involucrados en vías relacionadas con el sistema inmunológico, como *PIK3CD*, *WNT8A*, *CACNA1*, *VAV2*, *CD48*, *CD8A*, *NFATC2*, entre otros genes, por efecto del selenio. El gen *CD48* se asignó a la vía de citotoxicidad mediada por células asesinas naturales (Fig. 3); este gen, es miembro de la familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización y participa en la adhesión y activación de las células inmunes [20]. *CD48* es uno de los principales actores en la unidad efectora alérgica, funciona como un receptor activador y está implicado en varias enfermedades inmunológicas caracterizadas por inflamación [32]. Actualmente, *CD48* se estudia como un nuevo mecanismo de contra-ataque viral para alterar la vigilancia inmunitaria [21].

El antígeno *CD8* cadena alfa (*CD8A*), es fundamental para la defensa inmunitaria mediada por células y para el desarrollo de células T [33]. *CD8* puede tener actividad de conservación en la maduración y la distinción de linaje de las células T [34].

El gen *NFATC2* está involucrado en el complejo de transcripción de células T activadas y regula la transcripción de gran cantidad de genes. Por tanto, regula diversos procesos, incluida la diferenciación celular, la migración y la angiogénesis [35]. Actúa en la expresión inducible de genes de citocinas en células T, especialmente en la inducción de la interleucina IL-2, IL-3, IL-4 [36]; promueve la migración invasiva a través de la activación de la expresión de *GPC6* y la vía de señalización WNT5A [37]. Este gen *NFATC2* también está involucrado en las vías de señalización del receptor de células T, en la citotoxicidad mediada por células asesinas naturales, en la vía de señalización del receptor de células B y en la vía de señalización Wnt (Figura 3).

En un estudio [38] sobre el análisis del transcriptoma de ovejas con paratuberculosis sin suplementación de selenio, se identificaron siete vías asociadas con la inmunidad adaptativa. La mayoría de los genes identificados dentro de estas vías fueron reprimidos, incluyendo Co-receptores de TCR del receptor de células T *CD4* (-1.57 veces), *CD8A* (-2.33 veces) y *CD8B* (-2.28 veces). En otro estudio [39] en tejido de pulmón de la oveja Jaagsiekte infectado por retrovirus, los genes *CD8A* y *CD8B* se encontraron sub-regulados, lo cual contrasta con lo hallado en el presente trabajo, donde los genes *CD48* y *CD8A* fueron sobre-regulados bajo el efecto del selenio. En pollos en engorda sometidos a dietas supra nutricionales con selenio se detectaron ocho genes sobre-regulados en muestras de tejido del bazo, timo y bolsa de Fabricio [40]. Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer trabajo enfocado a estudiar el efecto del selenio en la expresión de los genes *CD8A*, *CD48* y *NFATC2*.

Es importante considerar que los folículos son la unidad fundamental del ovario, cuyas funciones principales son la producción de hormonas y de ovocitos. Asimismo, se debe destacar la implicación del sistema inmunológico en el desarrollo folicular, la esteroidogénesis, la

ovulación y la calidad de los ovocitos. Los resultados del presente trabajo subrayan la importancia que tiene el selenio para mejorar la inmunidad en los folículos pre-ovulatorios.

En este estudio se encontró que el selenio también afectó otras vías génicas o moleculares, incluidas las de transducción de señales, procesamiento de la información genética y cáncer. En estudios anteriores en gansos y ratas [27, 28], se encontraron resultados similares en estas vías, donde el alto nivel dietético de selenio puede modular la expresión de un gran número de genes en diferentes vías. Asimismo, Sirri *et al.* [41] demostraron que las dietas enriquecidas con vitamina E y selenio, afectaron vías implicadas con sistema inmunológico (migración transendotelial de leucocitos), en condiciones fisiológicas normales.

En cultivos de células cancerosas el selenio estimula la apoptosis [42]. Asimismo, existe literatura que señala que el nivel dietético óptimo de selenio asegura su adecuada actividad antioxidante y anticancerosa [43].

El presente estudio resalta el efecto de la suplementación con selenio en el transcriptoma de folículos de ovejas, provee un amplio escenario del sistema inmunológico que se desencadena en los folículos previo a la expresión genética cigótica y brinda información acerca de la expresión de genes maternos. Los hallazgos confirman la importante función del selenio en un tejido reproductivo como los folículos y corroboran la expresión de genes relacionados con la calidad del sistema inmunológico, asimismo la acción del selenio puede mejorar la calidad de los ovocitos maduros, un requisito, de vital importancia en la reproducción de ovinos.

4.6 CONCLUSIONES

La exposición *in vitro* de los folículos pre-ovulatorios de ovejas a 10 ng mL^{-1} de SeMet afectó la expresión de 2 538 genes. De ellos, algunos genes asociados a ocho vías reportadas a procesos inmunes. Entre los genes que sobresalieron por su expresión diferencial fueron *CD8A*, *CD48*, *NFATC2*. Estos genes y vías identificadas ratifican el efecto beneficioso del selenio en la calidad del sistema inmunológico de folículos, importante condicionante para la maduración de ovocitos, la fertilización y desarrollo posterior del embrión.

Abreviaturas

ACTB: Beta-actina

PB: Procesos biológicos

CC: componentes celulares

CD: Cluster de diferenciación

CD48: Cluster de diferenciación 48

CD8A: Cluster de diferenciación 8 alfa

DAVID: Base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado

eCG: Gonadotropina coriónica equina

GO: Ontología genética

IL: Interleucina

KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto

MEM: Medio esencial mínimo

MF: Funciones moleculares

ARNm: ARN mensajero

NFATC2: Factor nuclear de células T activadas, dependiente de calcineurina-2

NK: Asesino natural

Se: Selenio

SeMet: selenometionina

TCR: Receptor de células T

Agradecimientos

Agradecemos a la Unidad de Microarreglos de ADN de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los autores agradecen a la Dra. Balderas Martinez Yalbi Itzel del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México.

4.7 LITERATURA CITADA

1. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000;356(9225): 233-41.
2. Qazi IH, Angel C, Yang H, Pan B, Zoidis E, Zeng CJ, et al. Selenium, selenoproteins, and female reproduction: a review. *Molecules*. 2018;23(12): 3053. <https://doi.org/10.3390/molecules23123053>
3. Hoffmann PR, Berry MJ. The influence of selenium on immune responses. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52: 1273-80.
4. Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Malevu TD, et al. A summary of new findings on the biological effects of selenium in selected animal species-a critical review. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10): 2209.
5. Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, selenoproteins, and immunity. *Nutrients*. 2018;10(9): 1203. <https://doi.org/10.3390/nu10091203>.
6. Yao X, El-Samahy MA, Fan L, Zheng L, Jin Y, Pang J, et al. *In vitro* influence of selenium on the proliferation of and steroidogenesis in goat luteinized granulosa cells. *Theriogenology*. 2018;114: 70-80.
7. Grazul-Bilska AT, Caton JS, Arndt W, Burchill K, Thorson C, Borowczyk E, et al. Cellular proliferation and vascularization in ovine fetal ovaries: effects of undernutrition and selenium in maternal diet. *Reproduction*. 2009;137(4): 699-707.
8. Kim JY, Carlson BA, Xu XM, Zeng Y, Chen S, Gladyshev VN, et al. Inhibition of selenocysteine tRNA[Ser]Sec aminoacylation provides evidence that aminoacylation is

- required for regulatory methylation of this tRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409: 814-19.
9. 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.
 10. Yang H, Qazi IH, Pan B, Angel C, Guo S, Yang J, et al. Dietary selenium supplementation ameliorates female reproductive efficiency in aging mice. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(12): 634. <https://doi.org/10.3390/antiox8120634>.
 11. Hall JA., Sendek RL, Chinn RM, Bailey DP, Thonstad KN, Wang Y, et al. Higher whole-blood selenium is associated with improved immune responses in footrot-affected sheep. *Vet Res.* 2011;42: 99. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-99>.
 12. Hujerjiletu H, Bobe G, Vorachek WR, Gorman ME, Mosher WD, Pirelli GJ, et al. Selenium supplementation alters gene expression profiles associated with innate immunity in whole-blood neutrophils of sheep. *Biol Trace Elem Res.* 2013;154(1): 28-44.
 13. Chauhan SS, Celi P, Fahri FT, Leury BJ, Dunshea FR. Dietary antioxidants at supranutritional doses modulate skeletal muscle heat shock protein and inflammatory gene expression in sheep exposed to heat stress. *J Anim Sci.* 2014;92(11): 4897-908.
 14. Chauhan SS, Celi P, Leury BJ, Dunshea FR. High dietary selenium and vitamin E supplementation ameliorates the impacts of heat load on oxidative status and acid-base balance in sheep. *J Anim Sci.* 2015;93: 3342-54.
 15. Juszcuk-Kubiak E, Bujko K, Cymer M, Wicińska K, Gabryszuk M, Pierzchała M. Effect of inorganic dietary selenium supplementation on selenoprotein and lipid metabolism gene expression patterns in liver and loin muscle of growing lambs. *Biol Trace Elem Res.* 2016;172(2): 336-345.
 16. Elgendy R, Giantin M, Castellani F, Grotta L, Palazzo F, Dacasto M, et al. Transcriptomic signature of high dietary organic selenium supplementation in sheep: A nutrigenomic insight using a custom microarray platform and gene set enrichment analysis. *J Anim Sci.* 2016;94(8): 3169-3184.
 17. Steinbrenner H, Al-Quraishy S, Dkhil MA, Wunderlich F, Sies H. Dietary selenium in adjuvant therapy of viral and bacterial infections. *Adv Nutr.* 2015;6(1):73-82.
 18. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16: 705-743.
 19. Hoffmann FW, Hashimoto AC, Shafer LA, Dow S, Berry MJ, Hoffmann P.R. Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *Nutr.* 2010;140(6): 1155-1161.
 20. McArdel SL, Terhorst C, Sharpe AH. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin Immunol.* 2016;164: 10-20.

21. Martínez-Vicente P, Farré D, Sánchez C, Alcamí A, Engel P, Angulo A. Subversion of natural killer cell responses by a cytomegalovirus-encoded soluble CD48 decoy receptor. *PLoS Pathog.* 2019;15(4): e1007658.
22. Jiménez LM, Binelli M, Bertolin K, Pelletier RM, Murphy BD. Scavenger receptor-B1 and luteal function in mice. *J Lipid Res.* 2010;51(8): 2362-2371.
23. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
24. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1): 25-29.
25. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue): D277-80. doi: 10.1093/nar/gkh063. PMID: 14681412; PMCID: PMC308797.
26. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11): 2498-2504.
27. Cao N, Li W, Li B, Tian Y, Xu D. Transcriptome profiling reveals the immune response of goose T cells under selenium stimuli. *Anim Sci J.* 2017;88: 2001-2009.
28. Feng Y, Xing Y, Liu Z, Yang G, Niu X, Gao D. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in rats with selenium deficiency and identification of associated miRNA-mRNA network. *Sci Rep.* 2018;8(1): 6601.
29. Howard MT, Carlson BA, Anderson CB, Hatfield DL. Translational redefinition of UGA codons is regulated by selenium availability. *J Biol Chem.* 2013;288(27): 19401-19413.
30. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ. Selenium in the immune system. *J Nutr.* 2003;133(5Suppl1): 1457S-9S.
31. Song KD, Dowd SE, Lee HK, Kim SW. Long-term dietary supplementation of organic selenium modulates gene expression profiles in leukocytes of adult pigs. *Anim Sci J.* 2013;84(3): 238-46.
32. Pahima H, Puzzovio PG, Levi-Schaffer F. 2B4 and CD48: A powerful couple of the immune system. *Clin Immunol.* 2019;204: 64-68.
33. Parnes JR. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol.* 1989;44: 265-311.
34. Suetake H, Araki K, Akatsu K, Somamoto T, Dijkstra JM, Yoshiura Y, et al. Genomic organization and expression of CD8alpha and CD8beta genes in fugu *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol.* 2007;23(5): 1107-18.

35. Luk SJ, Hogendoorn PCW, Szuhai K. NFATC2 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2). Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. 2013;17(1): 35-39.
36. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(14): 5138-43.
37. Yiu GK, Kaunisto A, Chin YR, Toker A. NFAT promotes carcinoma invasive migration through glypican-6. Biochem J. 2011;440(1): 157-66.
38. Gossner A, Watkins C, Chianini F, Hopkins J. Pathways and genes associated with immune dysfunction in sheep paratuberculosis. Sci Rep. 2017;7: 46695. <https://doi.org/10.1038/srep46695>.
39. Karagianni AE, Vasoya D, Finlayson J, Martineau HM, Wood AR, Cousens C, et al. Transcriptional response of ovine lung to infection with jaagsiekte sheep retrovirus. J Virol. 2019;93(21): e00876-19.
40. Tang J, Huang X, Wang L, Li Q, Xu J, Jia G, et al. Supranutritional dietary selenium depressed expression of selenoprotein genes in three immune organs of broilers. Anim Sci J. 2017;88(2):331-338.
41. Sirri R, Vitali M, Zambonelli P, Giannini G, Zappaterra M, Lo Fiego DP, et al. Effect of diets supplemented with linseed alone or combined with vitamin E and selenium or with plant extracts, on longissimus thoracis transcriptome in growing-finishing italian large white pigs. J Anim Sci Biotechnol. 2018;9: 81. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0297-2>.
42. Park SH, Kim JH, Chi GY, Kim GY, Chang YC, Moon SK, et al. Induction of apoptosis and autophagy by sodium selenite in A549 human lung carcinoma cells through generation of reactive oxygen species. Toxicol Lett. 2012;212(3): 252-61.
43. Kuršvietienė L, Mongirdienė A, Bernatoniene J, Šulinskienė J, Stanevičienė I. Selenium anticancer properties and impact on cellular redox status. Antioxidants (Basel). 2020;9(1): 80. <https://doi.org/10.3390/antiox9010080>.

CONCLUSIONES GENERALES

El “selenio orgánico” disminuye el número de neutrófilos, a los 42 y 104 días de gestación, de basófilos a los cinco días de iniciado el tratamiento con selenio, ambas células intervienen durante toda la gestación. El selenio puede influir en el peso al destete dependiendo el sexo del cordero.

La adición de selenio orgánico, disminuye la frecuencia cardíaca (indicador de estrés), ante estrés producido por manejo cotidiano en ovejas durante todo el desarrollo pre-gestacional y gestacional en ovejas.

El “selenio orgánico” desempeña una función primordial en el primer tercio de la gestación y puede mantener el equilibrio homeostático del animal durante la gestación.

El selenio puede influir en la calidad del sistema inmunológico de los folículos pre-ovulatorios, al identificar 94 genes expresados diferencialmente en ocho vías relacionadas al sistema inmune, importante condicionante para el mantenimiento de la integridad y maduración de los ovocitos, la fertilización y el desarrollo posterior del embrión.