

Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa como indicador del balance metabólico nutricional de selenio en rebaños lecheros de Manizales, Colombia

Alejandro Ceballos¹, MVZ, MS; Herman Correa¹, MVZ; Juliana Loaiza¹, MVZ; Néstor A Villa¹, MVZ, MS

¹Departamento de Salud Animal, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.
aleceballos@cumanday.ucaldas.edu.co

(Recibido: 5 julio, 2002; aceptado: 21 febrero, 2003)

Resumen

Como indicador del balance metabólico nutricional del selenio (Se) y del cobre (Cu) y zinc (Zn) respectivamente se determinó la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px, EC 1.11.1.9) y superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) en hembras bovinas en diferente estado productivo. Se tomaron entre 5 y 10 mL de sangre heparinizada a animales de 4 grupos de edad diferentes en 8 rebaños lecheros de Manizales, Colombia (5° 4' LN y 75° 3' LO). Se determinó la concentración de hemoglobina y la actividad sanguínea de GSH-Px y SOD. Los resultados fueron analizados mediante estadística descriptiva y las comparaciones entre grupos se hicieron ANDEVA según correspondiera. La actividad de GSH-Px y SOD fue similar entre los grupos ($p > 0.05$). Las terneras lactantes presentaron la menor frecuencia de individuos con valores de actividad para GSH-Px inferiores a 100 U/g Hb, mientras que las novillas de vientre mostraron la mayor frecuencia. Las vacas preparto y en inicio de lactancia presentaron valores entre los observados para las terneras y novillas. Por lo anterior, en rebaños lecheros en pastoreo de Manizales, Colombia, se presentan deficiencias metabólicas nutricionales de Se, viéndose afectados con mayor frecuencia las novillas. Es necesario realizar otros estudios para establecer valores referenciales para la actividad SOD en bovinos.

Palabras clave: ganado lechero, glutatión peroxidasa, oligoelementos, superóxido dismutasa.

Introducción

La evolución acelerada que se ha ido presentando durante las últimas décadas en la industria lechera del país ha traído consigo la necesidad de reevaluar y mejorar los sistemas de manejo nutricional en los bovinos lecheros. Un componente de importancia en cualquier dieta son los oligoelementos, dado su carácter limitante de diferentes procesos metabólicos; entre aquellos, se encuentran el selenio (Se), cobre (Cu) y zinc (Zn).

Los oligoelementos se encuentran en baja cantidad en el organismo, intervienen en importantes

funciones orgánicas, como síntesis, crecimiento y diferenciación celular, regulan el metabolismo proteico, lipídico y de los carbohidratos, forman parte de la estructura proteica de enzimas o las activan y participan directa o indirectamente en la síntesis hormonal (26). Así, una de las funciones metabólicas conocidas de los minerales traza Se, Cu y Zn, es su participación como componente estructural de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GSH-Px, EC 1.11.1.9) (3, 13) y superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) (13, 14, 15), respectivamente, encargadas de proteger la célula y otras estructuras del daño producido por los metabolitos oxigenados reactivos (MOR), que producen alteraciones en la

estructura de diversas macromoléculas celulares como el DNA (2,25) y afectan tanto la funcionalidad celular como también la estructura de organelos intracelulares como mitocondria, lisosomas, pared y estructura celular (8).

La deficiencia de alguno de estos elementos ha sido asociada con diferentes patologías en el bovino, entre las que se han descrito la enfermedad del músculo blanco (9,30), la retención placentaria (2,7,18), infertilidad, abortos, parto prematuro, mortinatos (9,12), crías débiles, ovarios quísticos, metritis (9,18), mastitis (19,37), disminución de la tasa de concepción, períodos de estro débil o silente, diarrea, inmunosupresión (9,18), entre otras enfermedades.

La determinación de la actividad enzimática de GSH-Px y SOD permite conocer cuál es el balance metabólico nutricional de los elementos traza que intervienen en su formación (11,13), no dejando de reconocer que es más práctico evaluar directamente la concentración mineral en los tejidos; pero, la determinación de algunos minerales, Se entre otros, ofrece dificultad por la complejidad y costo de la técnica, además se requiere contar con equipos de un valor elevado. La evaluación de algunos minerales mediante las determinaciones de la actividad de las enzimas donde son formadores, es una forma de acercarse al balance nutricional del mineral en estudio en forma práctica, rápida y más económica. Así, ha sido descrito el desbalance de Se en diferentes países mediante la determinación de la actividad de GSH-Px en sangre, como Chile (5,6), Suecia (27,30), Francia (11), Finlandia (19) y Nueva Zelanda (23). Igualmente ha sido descrita la actividad enzimática correlacionada con el contenido de Se en el forraje (6) y se han encontrado diferencias según el estado productivo y época del año (5), y también según la región geográfica (9). No obstante, la actividad de SOD en bovinos no ha sido descrita tan ampliamente.

En Colombia han sido reconocidas algunas zonas como seleníferas, regiones en las que la toxicidad del Se ha sido asociada con lesiones como deformación de pezuñas, cojeras y caída del pelo del cuello y la cola en bovinos y otras especies. Tal es el caso del Magdalena Medio donde se han reportado casos

clínicos de selenosis*. Pese a lo anterior, la concentración de Se en las plantas varía con factores como el contenido del mineral, pH, solubilidad y formación de complejos con otros minerales en el suelo, lo que señalaría que no todas las zonas geográficas colombianas presentarían problemas de toxicidad con Se (24).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el balance metabólico nutricional de Se y de Cu y Zn en hembras bovinas lecheras en diferentes estados productivos de varias explotaciones en la zona de Manizales, Colombia, mediante la determinación de la actividad sanguínea de GSH-Px y SOD respectivamente y establecer las eventuales diferencias según la edad y el estado productivo.

Materiales y métodos

En el área rural del municipio de Manizales, Colombia (5° 4' LN y 75° 3' LO) se seleccionaron ocho rebaños según su sistema productivo. Los predios se localizaban entre 850 y 2400 msnm, en una zona con características climáticas determinadas por una convergencia intertropical que determina dos épocas de verano y dos lluviosas. En el área se encuentran temperaturas desde 12°C hasta 27°C, la humedad relativa es superior al 80% y la pluviosidad promedio fluctúa entre 1500 y 2000 mm/año.

El sistema productivo de los rebaños seleccionados se clasificaba en lechería especializada en pastoreo intensivo más suplementación o lechería especializada en pastoreo extensivo mejorado (34). En las zonas bajas no había una raza definida siendo predominante el mestizaje con diferentes razas, con un promedio de producción de 15 kg/vaca/día, mientras que en las zonas altas la raza predominante era Holstein con un promedio de producción de 24 kg/vaca/día. Se realizaban dos ordeños por día en todos los predios.

En el área destinada a la ganadería predominaban las gramíneas como especie forrajera, encontrando principalmente Estrella (*Cynodon sp.*), Guinea (*Panicum maximum*), Puntero (*Hyparrhenia rufa*) y Brachiaria (*Brachiaria sp.*) en las zonas bajas, y Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), Rye Grass

* Entrevista con Carlos Polo Galíndez, Profesor Titular Cátedra de Toxicología Veterinaria, Universidad de Caldas. Manizales, 11 de Enero de 2002.

(*Lolium sp*), Azul Orchoro (*Bromus catharticus*), Falsapoa (*Holcus lanatus*) y Riqueza (*Anthoxantum odoratum*) en las altas. La utilización se basaba en pastoreo directo o rotacional. La suplementación con alimentos concentrados comerciales se realizaba en siete de los ocho predios estudiados según el nivel productivo de la vaca excepto en un predio, a una proporción de un kilo de concentrado por 3.5 a 6.0 litros de leche producida. En todos los predios se suministraban sales mineralizadas y agua ad libitum. En sólo una de las sales mineralizadas usadas como suplemento aparecía el Se como componente de una premezcla mineral en una concentración del 0.0045%. En las sales aparecía el Cu en una concentración entre 0.12% y 0.25% y el Zn entre 0.5% y 0.8%. Las terneras se alimentaban con leche o lactoreemplazador hasta los 90 días, más concentrado hasta los 5 a 10 meses de edad y pastura verde a voluntad durante todo el período; en dos predios recibían leche hasta los 60 días. Las novillas de vientre recibían sal mineralizada a voluntad sin recibir suplementos hasta el parto.

Muestras

Entre marzo y junio de 2001 en cada rebaño se seleccionó un grupo de 20 animales conformado por cuatro subgrupos con cinco terneras lactantes menores de dos meses, cinco novillas de vientre, cinco vacas en período parto y cinco vacas en inicio de lactancia (menos de 60 días). De cada animal se obtuvieron entre 5 y 10 mL de sangre heparinizada mediante venopunción coccígea o yugular empleando el sistema de tubos al vacío (Vacutainer® B-D, Franklin Lakes, USA). Las muestras fueron remitidas dentro de 24 horas al Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Universidad de Caldas.

Análisis

Se determinó la concentración de hemoglobina mediante el método de la cianometahemoglobina (17) y la actividad de GSH-Px según la técnica descrita por Paglia y Valentine (28) y con las modificaciones señaladas por Ceballos *et al* (4, 5). La actividad de SOD fue determinada mediante un método enzimático colorimétrico (32). La actividad de ambas enzimas fue expresada en U/g Hb.

Análisis estadístico

Para conocer el tipo de distribución de los datos se utilizó la prueba de normalidad descrita por Pearson y Stephens (29). Los resultados fueron

descritos para cada grupo mediante la obtención del rango de actividad y el cálculo de las estimadas promedio (X) y desviación estándar (DE) (10). La comparación entre grupos se hizo empleando un análisis de varianza (ANDEVA) (38) paramétrico para GSH-Px y no paramétrico para SOD, la probabilidad de error se fijó en $p < 0.05$. El rango de referencia se determinó según el tipo de distribución de los datos, empleándose el método del promedio y desviación estándar para GSH-Px, y el método de los percentiles para SOD, fijando el rango entre los percentiles 2.5 y 97.2 (35).

Para la técnica analítica empleada en GSH-Px se ha señalado una actividad enzimática igual o menor a 60 U/g Hb como deficiente y una actividad igual o menor a 100 U/g Hb como marginal, siendo indicadores compatibles con una deficiencia de Se los valores inferiores a los señalados (5, 31). Por lo tanto, se presenta la frecuencia de individuos y grupos de animales con valores de actividad enzimática igual o inferior a estas cifras.

Resultados

Glutación Peroxidasa

El promedio y la desviación estándar de la actividad sanguínea de GSH-Px en los grupos estudiados fue 201 ± 106 U/g Hb, con un rango de actividad entre 7 y 538 U/g Hb. La actividad enzimática fue similar entre los grupos, no observándose diferencias entre ellos ($p > 0.05$), (véase Tabla 1).

Tabla 1. Promedio, desviación estándar y rango de la actividad sanguínea de glutación peroxidasa en grupos de animales de ocho rebaños lecheros GSH-Px de Manizales, Colombia.

Animales	Edad – estado productivo	Actividad de GSH-Px (U/g Hb)	
		$\bar{X} \pm DE^*$	Rango
Terneras	15 – 60 días	222 ± 101	43 – 474
Novillas	15 – 36 meses	181 ± 109	19 – 473
Vacas	Parto	216 ± 118	7 – 538
Vacas	Inicio de lactancia	188 ± 96	47 – 451

*Promedio de 8 rebaños con 5 animales por grupo, $p > 0.05$ entre grupos.

En el grupo de terneras lactantes se encontró 1 animal (2.6%) y en el grupo de novillas de vientre se encontraron 8 animales (20%) con una actividad enzimática inferior al valor señalado como indicador

de deficiencia, mientras que en el grupo de vacas preparto se encontró 1 animal (2.5%) y en el de vacas en inicio de lactancia 2 individuos (5.3%) con una actividad de GSH-Px en sangre considerada como deficitaria.

En el grupo de terneras lactantes se observó la menor frecuencia de individuos con una actividad marginal, mientras que el grupo de novillas de vientre mostró la mayor frecuencia, encontrándose 3 y 12 animales, respectivamente. En los grupos de vacas se encontraron 7 animales preparto, y 5 en el inicio de la lactancia con una actividad sanguínea de GSH-Px inferior al valor señalado como marginal, (véase Figura 1).

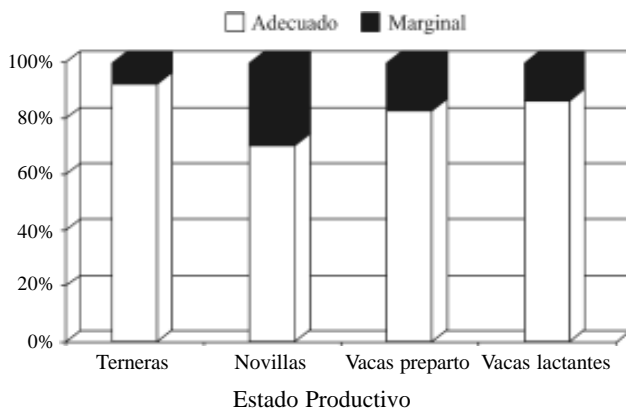


Figura 1. Frecuencia de individuos con una actividad marginal (<100 U/g Hb) para la actividad de GSH-Px en los grupos de terneras lactantes, novillas de vientre, vacas en preparto y vacas en el inicio de la lactancia de ocho rebaños lecheros de Manizales, Colombia.

Superóxido dismutasa

El promedio y la desviación estándar de la actividad sanguínea de SOD en los grupos estudiados fue 1249 ± 1180 U/g Hb, con un rango de 14 a 6061 U/g Hb. La actividad enzimática no presentó diferencias entre los grupos ($p > 0.05$), (véase Tabla 2).

Discusión

Glutación peroxidasa

Las terneras lactantes presentaron la menor frecuencia de individuos con valores marginales para la actividad de GSH-Px, (véase Figura 1). En otros estudios se ha señalado también que la actividad de esta enzima en terneras lactantes, presenta valores superiores al reportado por los mismos autores como marginal (5, 11). Se ha señalado que el Se puede

Tabla 2. Promedio, desviación estándar y rango de la actividad sanguínea de superóxido dismutasa en grupos de animales de ocho rebaños lecheros SOD de Manizales, Colombia.

Animales	Edad - estado productivo	Actividad de SOD (U/g Hb)	
		X \pm DE*	Rango
Terneras	15 – 60 días	1231 \pm 1202	14 – 4356
Novillas	15 – 36 meses	1153 \pm 1028	86 – 5555
Vacas	Preparto	1374 \pm 1182	68 – 4496
Vacas	Inicio de lactancia	1248 \pm 1335	41 – 6061

*Promedio de 8 rebaños con 5 animales por grupo, $p > 0.05$ entre grupos.

transferirse al feto a través de la placenta generando depósitos adecuados en el hígado y otros tejidos con lo que se pueden obtener niveles óptimos del elemento para mantener un estado nutricional satisfactorio por 2 a 3 meses; además, el Se puede transferirse por el calostro, aunque en una proporción más baja (11, 19). Así, estos depósitos de reserva pueden ser rápidamente movilizados permitiendo mantener una adecuada actividad de GSH-Px en sangre (16, 21).

Lo anterior sugiere que una suplementación mineral de las vacas durante el período preparto ajustada a los requerimientos nutricionales para esta época, puede mejorar la transferencia de Se al ternero tanto por vía transplacentaria como por el calostro, y además permitiría una buena actividad enzimática de GSH-Px durante los primeros meses de vida de las crías.

Las novillas de vientre mostraron la mayor frecuencia de individuos con actividad enzimática de GSH-Px marginal, (véase Figura 1). Resultados similares se han observado en Uruguay reportándose en novillas un promedio de actividad enzimática inferior al considerado como marginal (33). En Chile, empleando la misma técnica analítica usada en este estudio, se encontró en novillas un valor promedio de 99 U/g Hb en otoño y 70 U/g Hb en primavera, considerando como marginal una actividad de GSH-Px inferior a 100 U/g Hb (5).

Tanto las terneras de levante como las novillas dependen del forraje y la suplementación adicional después del destete; por lo anterior, mientras no se mantenga una adecuada suplementación en estos individuos, la reserva de Se es agotada trayendo como consecuencia una disminución de la concentración del mineral y seguidamente de la actividad de GSH-Px (5, 36). Dado que el contenido de Se en los forrajes

está relacionado con los niveles edáficos del mismo, el pastoreo de animales en desarrollo en campos deficientes trae como resultado el consumo de forrajes pobres en Se, lo que unido a una suplementación que no cubre los requerimientos provocaría una depleción en la actividad enzimática de GSH-Px (7, 20). Según lo anterior es posible encontrar en animales que pastan en praderas deficientes en Se, valores de actividad de GSH-Px bajos, afectando con mayor frecuencia a individuos en levante y novillas de vientre que dependen del pastoreo para cubrir sus necesidades de minerales y otros nutrientes.

Los grupos de vacas parto y en inicio de lactancia presentaron valores que se ubicaron entre los observados para las terneras lactantes y novillas de vientre. Resultados similares han sido reportados por otros autores que concuerdan en señalar una actividad de GSH-Px adecuada en vacas adultas, con valores superiores a los considerados bajos o marginales (1, 5, 11). La suplementación que reciben estos grupos de vacas con sales mineralizadas y con suplementos importados al predio, permiten generalmente un consumo adicional de minerales que asegura el mantenimiento de un estado metabólico nutricional mineral adecuado para este tipo de vacas.

En todos los predios evaluados se suplementan las vacas en el período parto y las vacas lactantes, suplementación que incluye concentrados de tipo comercial que pueden contribuir a mantener un adecuado ingreso de Se por presentar concentraciones mayores del mineral. En consecuencia, pueden elevarse los niveles de Se en hígado, sangre y otros tejidos, e incluso en la leche (23, 27). Una respuesta biológica a un mayor aporte de Se será el aumento de la actividad sanguínea de GSH-Px (27), lo que sucede en un lapso entre 1 y 4 semanas luego del inicio de la suplementación (22).

Lo anterior explicaría porqué no hay diferencias ($p > 0.05$) en la actividad enzimática entre los grupos de vacas parto y vacas en inicio de lactancia, pues

la actividad sanguínea de GSH-Px en el inicio de la lactancia se mantendría en niveles adecuados debido a la suplementación recibida desde el período parto y a la recibida al inicio de la lactancia. La variación característica de los análisis enzimáticos también contribuye a la ausencia de diferencias entre estos dos grupos de vacas, reflejo también de diferencias en el manejo nutricional de las vacas en las explotaciones estudiadas, lo que requiere de estudios posteriores.

Superóxido dismutasa

No se encontraron reportes en la literatura internacional acerca de la actividad sanguínea de SOD para bovinos, lo que dificulta la interpretación de los valores obtenidos en éste estudio. No obstante, en otras especies se han observado valores similares pero con una menor variación, posiblemente como consecuencia del consumo de dietas más equilibradas y de menores diferencias en su composición mineral. En humanos (32) se ha descrito un promedio de actividad, al igual que en equinos (4), similar al observado en este estudio. Se hace necesario en posteriores estudios correlacionar la actividad enzimática de SOD en bovinos con la concentración de Cu y Zn tanto en sangre como en el forraje.

Bajo las condiciones de este estudio y con los resultados obtenidos, es posible concluir que en la región de Manizales, Colombia, se presentan valores disminuidos de actividad sanguínea de GSH-Px, los que son compatibles con una deficiencia o un aporte marginal de Se en la dieta, encontrándose en las novillas de vientre la mayor frecuencia de individuos y grupos con valores de actividad enzimática bajos, lo que obedecería básicamente a los cambios en la alimentación y suplementación.

Para establecer valores referenciales para la actividad de SOD y su eventual utilización como una forma de evaluar el balance metabólico nutricional de minerales como Cu y Zn, se requiere la realización de nuevos estudios.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de los propietarios, administradores, asistentes técnicos y demás personas relacionadas con las ganaderías que permitieron la realización del presente estudio. Además, agradecemos a la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas por la financiación para realizar este trabajo.

Summary

Blood activity of glutathione peroxidase as an indicator of the nutritional metabolic balance of selenium in dairy herds of Manizales, Colombia.

This research was done to determine glutathione peroxidase and superoxide dismutase as an indicator of the nutritional metabolic balance of selenium (Se), and copper (Cu) and zinc (Zn) respectively in dairy herds. Four groups of animals were selected in eight herds located in Manizales, Colombia (5° 4' N and 75° 3' W). Blood samples were taken to analyze hemoglobin, and the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD). The results were analyzed using descriptive statistics, and the comparisons among groups were made using parametric or non-parametric tests accordingly. The enzymatic activity was similar for both enzymes among the groups of animals ($p>0.05$). Calves showed the smallest frequency of animals with an activity of GSH-Px below 100 U/g Hb (7.9%), while heifers showed the biggest frequency (30%). Prepartum and postpartum cows showed values between those observed for calves and heifers. Dairy herds from Manizales, Colombia, present nutritional deficiencies of Se, being affected more frequently the rearing grazing animals. More information is required to establish reference values for the activity of SOD in bovine.

Key words: dairy cattle, glutathione peroxidase, oligoelements, superoxide dismutase.

Referencias

1. Backall KA, Scholz RW. Reference values for a field test to estimate inadequate glutathione peroxidase activity and selenium status in the blood of cattle. *Am J Vet Res* 1979; 40:733-738.
2. Brzezinska-Slebodzinska E, Miller JK, Quigley JD, Moore JR, Madsen FC. Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. *J Dairy Sci* 1994; 77:3087-3095.
3. Burk RF, Hill KE. Regulation of selenoproteins. *Annu Rev Nutr* 1993; 13:65-81.
4. Ceballos A, Wittwer FG, Andaur M, Böhmwald HL. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en equinos del sur de Chile mantenidos en pastoreo. *Arch Med Vet* 1998; 30:339-340.
5. Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Böhmwald HL. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. *Arch Med Vet* 1998; 30:13-22.
6. Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Quiroz E, Böhmwald HL. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesq Agropec Bras* 1999; 34:2331-2338.
7. Ceballos A. Retención de placenta asociada con la deficiencia de selenio en bovinos lecheros. *Despertar Lechero* 1999; 16:45-61.
8. Combs Jr GE, Noguchi T, Scott ML. Mechanisms of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Fed Proc* 1975; 34:2090-2095.
9. Dargatz DA, Ross PF. Blood selenium concentrations in cows and heifers on 253 cow-calf operations in 18 states. *J Anim Sci* 1996; 74:2891-2895.
10. Doménech JM. *Bioestadística*, 3ed; Barcelona, Editorial Herder, 1980.
11. Enjalbert F, Lebreton P, Salat O, Schelcher F. Effects of pre- or postpartum selenium supplementation on selenium status of beef cows and their calves. *J Anim Sci* 1999; 77:223-229.
12. Herdt TH. Blood serum concentrations of selenium in female llamas (*Lama glama*) in relationship to feeding practices, region of United States, reproductive stage, and health of offspring. *J Anim Sci* 1995; 73:337-344.
13. Hill GM, Link JE, Meyer L, Fritsche KL. Effect of vitamin E and selenium on iron utilization in neonatal pigs. *J Anim Sci* 1999; 77:1762-1768.
14. Hough MA, Hasnain SS. Crystallographic structures of bovine copper-zinc superoxide dismutase reveal asymmetry in two subunits: functionally important three and five coordinate copper sites captured in the same crystal. *J Mol Biol* 1999; 287:579-592.
15. Hough MA, Strange RW, Hasnain SS. Conformational variability of the Cu site in one subunit of bovine CuZn superoxide dismutase: the importance of mobility in the Glu119-Leu142 loop region for catalytic function. *J Mol Biol* 2000; 304:231-241.
16. House WA, Bell AW. Sulfur and selenium accretion in the gravid uterus during late gestation in Holstein cows. *J Dairy Sci* 1994; 77:1860-1869.
17. Jain NC. *Schalm's veterinary hematology*, 4ed; Philadelphia, Lea & Febiger, 1986.
18. Jukola E, Hakkarainen J, Saloniemi H, Sankari S. Blood selenium, vitamin E, vitamin A and β -carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *J Dairy Sci* 1996; 79:838-845.
19. Jukola E, Hakkarainen J, Saloniemi H, Sankari S. Effect of selenium fertilization on selenium in feedstuffs and

- selenium, vitamin E, and β -Carotene concentrations in blood of cattle. *J Dairy Sci* 1996; 79:831-837.
20. Jukola E. Selenium, vitamin E, vitamin A and beta-carotene status of cattle in Finland, with special reference to epidemiological udder health and reproduction data. Academic dissertation, College of Veterinary Medicine, Helsinki, 1994.
 21. Kirk JH, Terra RL, Gardner IA, Wright JC, Case JT, y col. Comparison of maternal blood and foetal liver selenium concentrations in cattle in California. *Am J Vet Res* 1995; 56:1460-1464.
 22. Knight SA, Sunde RA. Effect of selenium repletion on glutathione peroxidase protein level in rat liver. *J Nutr* 1988; 118:853-858.
 23. Knowles SO, Grace ND, Wurms K, Lee J. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentrations in grazing cows. *J Dairy Sci* 1999; 82:429-437.
 24. McDowell LR. Minerals in animal and human nutrition, 1ed; San Diego, California, Academic Press Inc., 1992. 524p.
 25. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska J, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci* 1993; 76:2812-2823.
 26. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*, 25ed; Stamford, Connecticut, Appleton & Lange, 2000. 927p.
 27. Ortman K, Pehrson B. Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. *J Anim Sci* 1999; 77:3365-3370.
 28. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab and Clin Med* 1967; 70:158-169.
 29. Pearson ES, Stephens MA. The ratio of range to standard deviation in the same normal sample. *Biometrika* 1964; 51:484-487.
 30. Pehrson B, Ortman K, Madjid N, Trafikowska U. The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves. *J Anim Sci* 1999; 77:3371-3376.
 31. Randox Laboratories. Ransel: Glutathión peroxidasa. Informe técnico. Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK, 1996.
 32. Randox Laboratories. Ransod: Superóxido dismutasa. Informe técnico. Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK, 1996.
 33. Ricciardino MZ, Medus PD, Gómez M, Ruksan BE. Deficiencia de cobre y selenio en vaquillonas sobre pastura natural. 1: Causas y efectos inherentes a la pastura. *Prod Anim* 1991; 3:213-221.
 34. Rivera B, Vargas JE, Arcila CP, Márquez R, Pérez JF, y col. Propuesta para la clasificación de sistemas de producción de leche: El caso de la zona de influencia de Manizales. *Rev Sist Prod* 1999; 10:83-103.
 35. Weisbrot IM. Statistics for the clinical laboratory. JB Lippincott Company, Philadelphia, USA. 1985. 198p.
 36. Weiss PA, Colenbrander VF, Cuningham MD. Maternal transfer and retention of supplemental selenium in neonatal calves. *J Dairy Sci* 1984; 67:416-420.
 37. Weiss WP, Hogan JS, Todhunter DA, Smith KL. Effect of vitamin e supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80:1728-1737.
 38. Zar JH. Biostatistical analysis, 3ed; Upper Saddle River, Prentice Hall, 1996. 662p.