

## Efecto de una dieta con bajo aporte de selenio sobre la respuesta inmune a la vacuna *Brucella abortus* Cepa RB51 en vacas lecheras<sup>#</sup>

Effect of a low selenium diet on the immune response to *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in dairy cows.

V Leyán<sup>1\*</sup>, F Wittwer<sup>3</sup>, P A Contreras<sup>3</sup>, G Schurig<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

<sup>2</sup> Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine Virginia Tech, USA.

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

### SUMMARY

The effect of a diet with a low selenium (Se) content on the immune response to *Brucella abortus* Strain RB51 vaccine in dairy cows and in their serum immunoglobulin concentrations was studied. Twelve pregnant Friesian cows (7 to 8 months) were randomly allocated into two homogeneous groups of six animals each. Animals were maintained during 6 months in individual cubicles with water *ad libitum* and a diet based on grass hay with a low Se content (0.02 ppm base on dry matter) and nutritionally balanced for other nutrients. One group was maintained only with the low Se diet (Se-D) and the other group (Se-S) was treated with barium selenate (1 mg Se/kg sc) 45 days before calving. All off the cows were immunized with *Brucella abortus* RB51 vaccine during the fourth month of the experiment. Blood samples were obtained before supplementation and thereafter every 15 days for determination of the GSH-Px activity in erythrocytes. Serum IgG, IgM and IgA concentrations were determined by the immunodiffusion radial method. Anti *Brucella abortus* antibodies were determined by an ELISA technique. Cellular immune response to *Brucella abortus* antigen was evaluated by intradermic reaction test and histological analysis. Erythrocyte GSH-Px activity in the Se-D group decreased to deficient values (<60 U/g Hb) on day 150 of the experiment, while that in the Se-S group increased and remained within adequate values (>130 U/g Hb) during the entire experimental period. Serum concentrations of IgG, IgM and IgA were similar in both groups of cows and also there were no differences (P>0.05) in the humoral and cellular immune responses to RB51 vaccine. These results suggest that the use of a diet with a low Se content does not affect the humoral and cellular response to RB51 vaccine.

*Palabras clave:* selenio, inmunidad, *Brucella abortus*.

*Key words:* selenium, immunity, *Brucella abortus*.

### INTRODUCCION

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) se encuentra estrechamente asociada al balance nutricional de selenio (Se) en el bovino (Stowe y Herdt 1992, Ceballos y col 1998, Ceballos y col 1999). Esta enzima cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno, protegiendo a la célula del daño causado por el estrés oxidativo (Rotruck y col 1973, Castillo y col 2001). Los requerimientos de Se en bovinos fluctúan entre 0,1 y 0,3 ppm (NRC 2001). Dietas con concentraciones menores de 0,03 ppm se asocian con alteraciones de la salud y la producción (Underwood y Suttle 1999). La principal fuen-

te de aporte de Se en bovinos a pastoreo la constituyen la pradera natural y los forrajes conservados, alimentos que en el sur de Chile presentan en un alto porcentaje un bajo contenido de este microelemento (Ceballos y col 1998, Wittwer y col 2002). Debido a que esta condición predispone a los animales a presentar patologías asociadas a la deficiencia de Se, es común la suplementación con Se como forma de prevenir esta situación.

Con relación a los efectos del Se sobre la respuesta inmune, los antecedentes disponibles entregan resultados variables y algunas veces contradictorios, es así que en algunos casos se asocia con un aumento y en otros casos con una disminución de la respuesta inmune humoral y celular (Finch y Turner 1996, Swecker 1997). Los escasos estudios que relacionan el estatus de Se con la respuesta inmune a la *Brucella abortus* señalan que la suplementación con Se no afecta la respuesta inmune humoral a la vacuna Cepa 19 (Nemec y col 1990) y a la vacuna *Brucella abortus* Cepa RB51 (Leyán y col 2005).

Aceptado: 17.01.2006.

<sup>#</sup> Financiado por Proyecto Fondecyt N° 119-0993.

\* Correspondencia: E-mail: vleyan@uach.cl, Casilla N° 567, Valdivia, Chile.

Sin embargo, este último estudio también señala que la suplementación en animales con un estatus normal de Se provoca una disminución de la respuesta celular.

Considerando que la mayor parte de la ganadería en Chile se concentra en áreas geográficas con deficiencia de Se, así como la práctica cada vez más frecuente de suplementar con Se en animales que son vacunados contra las enfermedades prevalentes en la región y, en particular, contra la brucelosis bovina, se planteó la necesidad de estudiar el efecto de una dieta con bajo contenido de Se sobre la respuesta inmune inducida por la vacuna *Brucella abortus* Cepa RB51 y la concentración de inmunoglobulinas séricas, empleando un modelo experimental de alimentación controlada en vacas lecheras.

## MATERIAL Y METODOS

*Animales y grupos experimentales.* Se utilizaron 12 vacas Frisón Negro entre 4 y 9 años de edad con 7-8 meses de gestación, provenientes de un predio lechero libre de tuberculosis, leucosis y brucelosis. Los animales fueron asignados al azar a dos grupos de 6 vacas cada uno, homogéneo en edad ( $6,5 \pm 0,9$  años), número de partos ( $3,5 \pm 1,4$ ), peso corporal ( $594 \pm 69,7$  kg), tiempo de gestación (230 días), producción de leche en la última lactación ( $6406 \pm 852,6$  l) y alimentados con una dieta de bajo contenido de Se. Un grupo fue alimentado sólo con la dieta pobre en Se (Se-D), mientras que al otro grupo se les restituyó el balance nutricional normal de Se mediante la suplementación con Se (Se-S).

*Alimentación y manejo.* Los animales fueron mantenidos durante todo el experimento en estabulación permanente (piso de hormigón con cama de paja y comederos individuales) y agua *ad libitum*. A partir de aproximadamente 45 días antes del parto los animales fueron alimentados con 9,5 kg de heno de pradera natural (Se=0,02 ppm de materia seca (MS)), más 1 kg de concentrado comercial (Se=0,12 ppm de MS). Posterior al parto, los animales fueron mantenidos en similares condiciones, con dos ordeñas al día (14 L/día) y una ración diaria de 11,5 kg de heno (Se=0,02 ppm), concentrado (Se=0,12 ppm) hasta 5 kg, según requerimientos por producción, 0,5 kg de afrecho de soya (Se=0,17 ppm de MS), 0,5 kg de sebo para alimentación animal (Se<0,01 ppm de MS), urea 0,12 kg (Se < 0,01 ppm de MS) y 0,15 kg de mezcla mineral sin Se.

El contenido de Se de la ración fue medido mediante espectroscopia de plasma acoplado inductivamente con detector de masa (ICP-MS), en muestras digeridas en ácido nítrico y perclórico<sup>1</sup>. El aporte de Se en la ración fue de 0,048 ppm de MS (equivalente al 16% de los requerimien-

tos según NRC 2001). En el transcurso del período de estudio se registró la condición corporal de todos los animales utilizando la escala de 1 a 5 según Edmonson y col (1989).

*Suplementación con selenio.* El grupo Se-S fue suplementado con 1 mg de Se/kilo de peso vivo (pv) usando selenato de bario<sup>2</sup> en dosis única de 1 ml/50 kg/pv subcutáneo, administrado aproximadamente 45 días antes del comienzo de los partos. De cada vaca se tomaron dos muestras de sangre (con y sin heparina), por venopunción coccígea previo a la suplementación y luego cada 15 días durante todo el experimento, el suero obtenido fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

*Evaluación de la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px).* La actividad sanguínea de GSH-Px se evaluó quincenalmente en hemolizados de las muestras de sangre con heparina. Su determinación se realizó empleando reactivos comerciales<sup>3</sup> basados en la técnica cinética compuesta NADPH-dependiente descrita por Paglia y Valentine (1967) modificada según Ceballos y col (1998). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi 4020<sup>4</sup> y la actividad fue expresada en U/g Hb.

*Inmunización con la vacuna RB51.* Todos los animales fueron inmunizados con una dosis completa ( $1-3,4 \times 10^{10}$ ) de la vacuna *Brucella abortus* Cepa RB51<sup>5</sup>, 100 días posteriores a la administración de Se.

*Preparación antigénica del extracto total de RB51.* Para las pruebas de intradermoreacción se preparó antígeno de *Brucella abortus* Cepa RB51 de acuerdo al protocolo descrito por Leyán y col (2005). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando un kit comercial<sup>6</sup>.

*Determinación de la concentración de inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA en suero.* Se cuantificaron mediante el método de inmunodifusión radial<sup>7</sup>. La determinación se realizó previo a la administración de Se (día 0) y posterior a la administración de Se, los días 30, 60 y 90.

*Determinación de la respuesta inmune humoral específica a la vacuna RB51.* La respuesta humoral se determinó por el método de ELISA indirecto en muestras de suero

<sup>1</sup> Hill Laboratories, N Z.

<sup>2</sup> DeposeI, Young Animal Health Ltd., NZ.

<sup>3</sup> RANSEL®. Laboratorios Randox, Crumlin, UK.

<sup>4</sup> Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.

<sup>5</sup> Professional Biological Company, Denver, Co, USA.

<sup>6</sup> Bio-Rad, Hercules CA.

<sup>7</sup> BINDARID®. The Binding Site, UK.

(1:2000) obtenidas los días 0, 15, 30, 45 y 60 desde la vacunación. En resumen, la placa de poliestireno se sensibilizó con 0,5 µg de proteína del extracto total de RB51 por pocillo, se adicionó el suero y fueron incubadas a 4°C durante 18 horas. Para detectar los anticuerpos anti *Brucella abortus*, se utilizaron anticuerpos anti IgG de bovino unidos a peroxidasa<sup>8</sup>. Posteriormente la reacción fue revelada con o-Phenylenediamine<sup>9</sup> y peróxido de hidrógeno como sustrato. La lectura se realizó en un lector de ELISA EL<sub>x</sub> 800 automático<sup>10</sup>.

**Determinación de la respuesta inmune celular específica a la vacuna RB51.** La respuesta inmune celular se evaluó mediante pruebas de intradermorreacción y análisis histológico:

**Intradermo reacción.** Se efectuó en los dos grupos de animales previamente sensibilizados con la administración de la vacuna RB51. La respuesta se determinó 60 días después de la vacunación mediante inyección intradérmica del extracto de *Brucella abortus* Cepa RB 51 en la región cervical, en dosis de 16 µg y 32 µg. La lectura se realizó a las 72 h con un cutímetro de resorte. Como control de la reacción se utilizó Tuberculina PPD bovino<sup>11</sup> en los mismos animales. Como control de la especificidad del antígeno se realizó la prueba de intradermo reacción a terneras no inmunizadas con RB51.

**Estudio histológico.** Se realizó en muestras de tejido obtenidas mediante biopsia del área de reacción de la piel. Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 3,9% y procesadas de acuerdo a las técnicas histológicas convencionales. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina y eosina para su estudio.

**Análisis estadístico.** Se determinaron las medias, desvíos y error estándar por grupo y período de muestreo para cada variable. Posterior a evaluar la normalidad de la distribución de los datos (Kolmogorov-Smirnov) y su homocedasticidad (Bartlett's), las diferencias entre períodos se evaluaron mediante ANDEVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de "t" de Student. Los análisis se realizaron con el programa Prism 3.0 y se empleó un nivel de significancia del 95%.

## RESULTADOS

El ensayo comprendió el período preparto, parto y lactancia de las vacas, tiempo en el cual los animales de

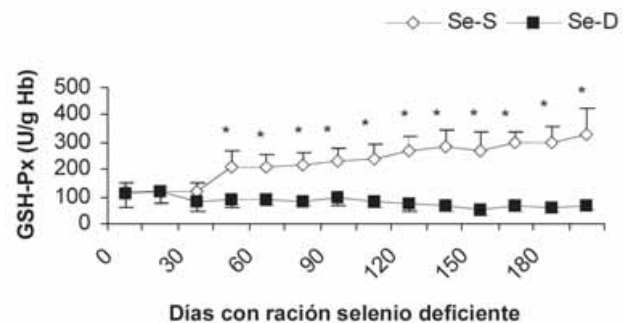
ambos grupos presentaron variaciones en su condición corporal propias a su estado fisiológico, sin mostrar diferencias entre los grupos ( $P > 0,05$ ). El preparto fue de 3,3 para descender a 2,3 al mes de lactancia y recuperarse a 3,0 a los 180 días de lactancia.

Los animales mantenidos sólo con la ración con bajo contenido de Se presentaron una disminución ( $P < 0,05$ ) en la actividad de GSH-Px hasta valores considerados bajos ( $< 100$  U/g Hb) a los 30 días y deficientes ( $< 60$  U/g Hb) a los 150 días. La suplementación con selenato de bario aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) la actividad de GSH-Px desde  $118,5 \pm 29$  U/g Hb (previo a la suplementación) a valores mayores de 300 U/g Hb al final del período experimental (figura 1).

Las concentraciones de IgG, IgM e IgA de ambos grupos de animales fueron similares ( $P > 0,05$ ) (cuadro 1). Por otra parte, entre los días 30 y 60 postsuplementación, correspondiente con el período de partos, se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) de la concentración de inmunoglobulinas IgG en ambos grupos (cuadro 1).

La inducción de respuesta inmune humoral específica a la vacuna RB51 en ambos grupos de animales desarrolló similar cinética de producción de anticuerpos, con un aumento ( $P < 0,05$ ) en el día 15 postinmunización (figura 2). Aun cuando no se presentaron diferencias entre grupos ( $P > 0,05$ ), se observó una tendencia a títulos de anticuerpos más alto en el grupo Se-S (figura 2).

A las 72 h de iniciadas las pruebas de intradermo reacción, se observó aumento de volumen e induración local en ambos grupos de animales. Las respuestas, tanto al usar 16 µg como 32 µg de proteína total de *Brucella abortus* (figura 3), fueron similares para ambos grupos, con una tendencia a ser mayor en el grupo Se-S, sin llegar a ser estadísticamente significativa. El análisis histológico



Día 0: Suplementación con selenio.

Día 100: Inmunización con RB51.

Día 160: Intradermorreacción.

\*  $P < 0,05$  entre grupos.

**Figura 1.** Variación de la actividad sanguínea de GSH-Px (promedio  $\pm$  DE) en vacas alimentadas con una dieta pobre en selenio (Se-D,  $n=6$ ) y suplementadas con selenio como selenato de bario (Se-S,  $n=6$ ).

Changes in blood GSH-Px activity (mean  $\pm$  SD) in cows fed with a low selenium diet (Se-D,  $n=6$ ) and cows supplemented with barium selenate (Se-S,  $n=6$ ).

<sup>8</sup> Capel, ICN Pharmaceuticals, Inc. USA.

<sup>9</sup> Sigma, USA.

<sup>10</sup> Bio-Tek Instruments Inc. USA.

<sup>11</sup> Intervet Chile Ltda. Chile.

**Cuadro 1.** Concentración sérica (promedios  $\pm$  DE en g/L) de IgG, IgM e IgA en vacas alimentadas con una dieta con bajo contenido de selenio (Se-D, n=6) y suplementados con selenio como selenato de bario (Se-S, n=6).

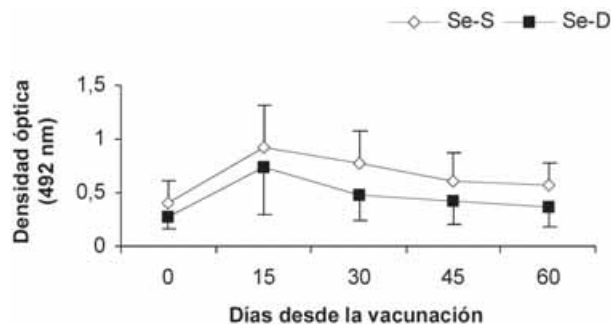
Mean serum IgG, IgM and IgA concentrations (mean  $\pm$  DE in g/L) in cows fed with a low selenium diet (Se-D, n=6) and cows supplemented with barium selenate (Se-S, n=6).

Ig	Grupo	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
IgG	Se-S	51,15 $\pm$ 5,43	* 27,18 $\pm$ 8,99	31,87 $\pm$ 5,45	40,93 $\pm$ 9,86
	Se-D	43,67 $\pm$ 6,99	* 30,90 $\pm$ 6,76	33,27 $\pm$ 5,80	41,23 $\pm$ 5,97
IgM	Se-S	3,09 $\pm$ 0,89	2,94 $\pm$ 0,79	2,67 $\pm$ 0,49	2,67 $\pm$ 0,75
	Se-D	3,41 $\pm$ 1,64	2,90 $\pm$ 1,52	2,40 $\pm$ 1,35	2,57 $\pm$ 0,90
IgA	Se-S	0,19 $\pm$ 0,12	0,17 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,12
	Se-D	0,15 $\pm$ 0,08	0,11 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,04

Día 0: Suplementación con selenato de bario.

\* P<0,05 diferente del día 0.

Ig = Inmunoglobulina.



Día 0: Inmunización con RB51, 60 días posterior a la suplementación con selenio.

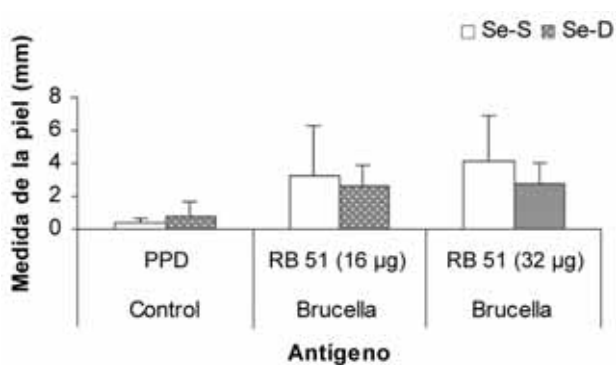
**Figura 2.** Cinética de la producción de anticuerpos (promedio  $\pm$  DE) contra la proteína total de RB51, en vacas alimentadas con una dieta pobre en selenio (Se-D, n=6) y suplementados con selenio como selenato de bario (Se-S, n=6).

Kinetics of antibody production (mean  $\pm$  SD) against total protein of strain RB51 antigen in cows fed with a low selenium diet (Se-D, n=6) and cows supplemented with barium selenate (Se-S, n=6).

de la reacción inflamatoria en el sitio de estimulación en ambos grupos de animales demostró infiltrado inflamatorio mononuclear con presencia de eosinófilos (figura 4). Por otra parte, las pruebas de intradermo reacción realizadas con tuberculina en los mismos animales y las realizadas con extracto de RB51 en terneras no vacunadas contra brucelosis fueron negativas.

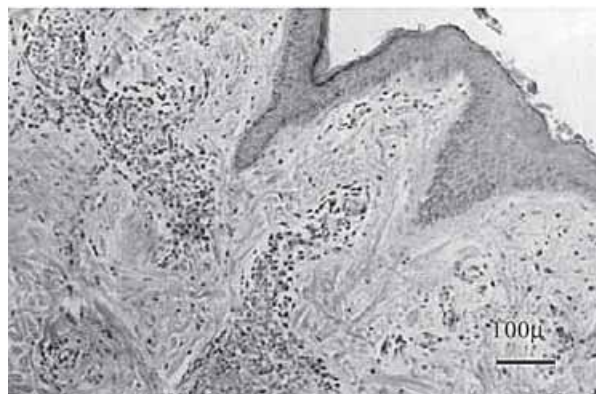
**DISCUSION**

La condición corporal de los animales de ambos grupos disminuyó progresivamente durante el período experimental, como consecuencia de la producción láctea y el estricto control en la alimentación. El efecto de la dieta



**Figura 3.** Medida de la piel en la prueba de intradermo reacción (promedio  $\pm$  DE) usando 16  $\mu$ g y 32  $\mu$ g de proteína total de RB51, en vacas vacunadas con RB51 y alimentadas con una dieta pobre en selenio (Se-D, n=6) y suplementados con selenio como selenato de bario (Se-S, n=6). Se utilizó una prueba control usando Tuberculina (PPD) en los mismos animales.

Skin measurements of the intradermic reaction test (mean  $\pm$  DE) to the inoculation of a preparation of protein from strain RB51 antigen (16  $\mu$ g and 32  $\mu$ g) in cows fed with a low selenium diet (Se-D, n=6) and cows supplemented with barium selenate (Se-S, n=6).



**Figura 4.** Biopsia de piel de una vaca alimentada con una dieta pobre en selenio. Infiltrado inflamatorio mononuclear con presencia de eosinófilos en el sitio de inyección de el antígeno RB51.

Skin biopsy from a cow fed with a low selenium diet. Inflammatory mononuclear infiltrate with presence of eosinophils observed at the site of strain RB51 antigen intradermal injection.

con bajo contenido de Se se tradujo en una disminución lenta y progresiva de la actividad de la enzima GSH-Px en los eritrocitos, que se hizo mínima a los 150 días. Por otra parte, la suplementación con Se aumentó la actividad de GSH-Px desde los 45 días con respecto al valor basal, tiempo que guarda relación con la incorporación del Se a las seleno enzimas en el glóbulo rojo durante la eritrogénesis (Grace 1994). El efecto del selenato de bario se mantuvo durante los 6 meses de estudio debido a la lenta liberación del Se (Lee y col 1999), de manera similar a lo observado por Leyán y col (2005) al utilizarlo en vaquillas con mismos propósitos.

La disminución de IgG en ambos grupos, entre los días 30 y 60 con respecto al valor basal del día 0 coincide



con el período periparto, en el cual se produce el transporte activo de inmunoglobulina IgG1 desde la circulación sanguínea a la glándula mamaria (Larson y col 1980). Aun cuando no se presentan diferencias significativas en la concentración de IgG entre ambos grupos, permanece la duda si la eficiencia del transporte activo a la glándula mamaria fue mayor en los animales suplementados, como ha sido sugerido por Swecker y col (1995). En este mismo sentido Leyán y col (2004) señalaron que el uso de selenato de bario en vacas gestantes selenio-deficientes disminuye la concentración de IgG1 sin afectar los niveles de IgG total en el calostro.

Si bien los anticuerpos inducidos por la vacuna RB51 contra *Brucella abortus* no son detectados con la prueba de aglutinación rápida usada como prueba de campo, estos sí son detectados mediante ELISA (Schurig y col 1991, Cheville y col 1993, Jiménez de Bagues y col 1994). Al respecto, los resultados demostraron que la deficiencia de Se no alteró cualitativamente la respuesta de anticuerpos durante todo el experimento; sin embargo, durante todo el período de estudio se observó una tendencia levemente mayor en los animales suplementados. En ambos grupos el aumento del día 15 corresponde a la respuesta secundaria a la revacunación, ya que estos animales provenían de un predio libre de brucelosis y habían sido vacunados entre los 3 y 8 meses de edad con la vacuna Cepa 19. Es interesante señalar que aun cuando las diferencias entre grupos no son significativas durante el período experimental, la persistencia de los títulos es levemente mayor en los animales suplementados con Se. Estudios previos también señalan que la suplementación con Se no tiene efecto significativo sobre la respuesta inmune humoral a *Brucella abortus* en vaquillas (Nemec y col 1990, Leyán y col 2005).

La respuesta cutánea al antígeno total de *Brucella* demostró ser específica, ya que el grupo de animales no vacunados usados como control no presentó reacción local ni alteraciones microscópicas en el tejido. La reacción en los animales vacunados indica desarrollo de la inmunidad celular, la cual es importante para la protección contra la enfermedad natural (Oliveira y col 2002, Wyckoff 2002). Un aspecto importante de considerar es la relación entre la actividad de GSH-Px y la reacción intradérmica; al respecto, los animales suplementados tenían una actividad de GSH-Px de 280 U/g Hb en el momento de realizar la prueba. En este mismo sentido, los resultados informados por Leyán y col (2005), utilizando similares condiciones experimentales en vaquillas, señalan que en animales con 400 U/g Hb se produjo una disminución de la respuesta inmune celular. Esta diferencia sugiere que en los animales deficientes de Se la suplementación con selenato de bario no afectaría o tiende a mejorar la respuesta, pero en animales con estatus normal de Se su suplementación eleva la actividad de GSH-Px a valores que coinciden con una disminución de la respuesta celular (Leyán y col 2005).

La ausencia de diferencias en los valores obtenidos, tanto en la respuesta inmune específica como en la concentración de inmunoglobulinas séricas, no se relaciona con las marcadas diferencias entre grupos que establece la medición de la actividad enzimática de GSH-Px. Este hecho nos estaría revelando que otros mecanismos que son independientes de la actividad de GSH-Px podrían intervenir en la modulación de la capacidad antioxidante, dando lugar a una respuesta biológica compensatoria en la red antioxidante destinada a minimizar los efectos de la deficiencia nutricional, lo que otorgaría protección a las células involucradas en la respuesta inmune. En este sentido, se ha visto que algunas isoformas de glutatión transferasa, no dependientes de Se, pueden ser inducidas en situaciones de deficiencia de Se, incrementando su actividad y contribuyendo a la eliminación de peróxidos orgánicos (Chang y col 1990). Por otra parte, también se ha señalado que la disminución de la actividad de GSH-Px parece ser compensada con un incremento en la actividad de la catalasa (Himeno y col 1993). Estos mecanismos contribuirían a mantener la capacidad de respuesta frente a una agresión oxidativa. También es necesario considerar que el rol que desempeña GSH-Px sería secundario en la protección y estabilidad de los lípidos de membrana, pudiendo ser más importante el estatus de vitamina E que el de Se (Gutzwiller 1998). Desde otro punto de vista, se ha sugerido que el rol de GSH-Px como enzima antioxidante *in vivo* podría ser menor que su función homeostática, como una forma de almacenamiento de Se (Nève 2000). Por otra parte, un factor importante que se debe considerar al momento de explicar la ausencia de diferencias entre grupos Se-S y Se-D proviene de los estudios desarrollados por Weitzel y col (1990) y Guan y col (1995), quienes encontraron que la isoforma GSH-Px fosfolípido hidropéroxido disminuye su actividad más lentamente que la celular. El rol biológico que desempeña es sinérgico a la vitamina E y consiste en remover los fosfolípidos hidropéroxidados a nivel de membranas y que no constituyen sustrato para la GSH-Px celular. Esto determina que en situaciones de deficiencia de Se, en donde la actividad de GSH-Px celular se ve fuertemente deprimida, la actividad enzimática de GSH-Px fosfolípido hidropéroxido continúe expresándose por un lapso más prolongado permitiendo a la célula soportar una agresión oxidativa.

Evaluar la influencia de la nutrición sobre la respuesta inmune es compleja, especialmente en vacas en producción, ya que los animales se encuentran influenciados por el estrés ambiental, condiciones reproductivas como la gestación y el parto, las exigencias de producción de leche y distintos desafíos antigénicos ambientales. Aun así, los resultados preliminares obtenidos en este estudio de diseño experimental de alimentación controlada permiten concluir que un bajo aporte nutricional de Se no afecta en forma significativa la inmunocompetencia en vacas de lechería. Sin embargo, se requieren mayores es-

tudios tendientes a establecer con mayor precisión el efecto del estatus de Se (GSH-Px) sobre la respuesta inmune.

## RESUMEN

Se estudió el efecto de una dieta con bajo aporte de selenio (Se) sobre la respuesta inmune a la vacuna *Brucella abortus* Cepa RB51 y la concentración de inmunoglobulinas séricas en vacas. Se utilizaron 12 vacas Friesian, estabuladas desde aproximadamente dos meses preparto y hasta el cuarto mes de lactancia mantenidas con una dieta basada en heno de pradera con bajo contenido de Se (0,02 ppm de MS) y balanceada según requerimientos para el resto de nutrientes. Seis vacas conformaron el grupo de animales con bajo aporte de Se (Se-D) y otras seis el grupo de animales suplementados (Se-S) con selenato de bario (1 mg de Se/kg), 45 días previos al parto.

Los animales fueron inmunizados con la vacuna RB51 al cuarto mes del experimento. Muestras de sangre fueron obtenidas previo a la suplementación con Se y cada 15 días hasta el término del experimento. El balance de Se fue medido mediante la actividad sanguínea de GSH-Px. Las concentraciones séricas de IgG, IgM e IgA se determinaron por inmunodifusión y los anticuerpos específicos contra *Brucella abortus* mediante ELISA y la respuesta inmune celular mediante pruebas de intradermorreacción a antígenos de *Brucella abortus* y estudio histológico de la reacción.

La dieta con bajo contenido de Se provocó una disminución lenta y progresiva de la actividad de GSH-Px (< 60 U/g Hb), mientras que la administración de selenato de bario incrementó su actividad (>130 U/g Hb) durante el período experimental. No se observaron diferencias ( $P>0,05$ ) en las concentraciones séricas de IgG, IgM e IgA y en la respuesta inmune humoral y celular a la vacuna RB51 entre ambos grupos experimentales. Los resultados sugieren que un bajo aporte de Se no afecta la respuesta inmune humoral ni celular a la vacuna RB51.

## REFERENCIAS

- Castillo C, JL Benedito, M López-Alonso, M Miranda, J Hernández. 2001. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: su relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch Med Vet* 23, 5-20.
- Ceballos A, F Wittwer, PA Contreras, H Bohmwald. 1998. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. *Arch Med Vet* 30, 13-22.
- Ceballos A, F Wittwer, PA Contreras, E Quiroz, H Böhmwald. 1999. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesq Agrop* 34, 2331-2338.
- Chang M, JR Burgess, RW Scholz, CC Reddy. 1990. The induction of specific rat liver glutathione-S-transferase subunits under inadequate selenium nutrition causes an increase in prostaglandin  $F_2\alpha$  formation. *J Biol Chem* 265, 5418-5423.
- Chevillat NF, MG Stivens, AE Jensen, FM Tatum, SM Halling. 1993. Immune response and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strain of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 54, 1591-1597.
- Edmonson AJ, IJ Lean, LD Weaver, T Farver, G Webster. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 72, 68-78.
- Finch JM, RJ Turner. 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Res Vet Sci* 60, 97-106.
- Guan JY, S Komura, N Ohishi, K Yagi. 1995. Difference in effects of classic and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases on liver lipid peroxide level in selenium-deficient rats. *Biochem Mol Biol Int* 37, 1103-1110.
- Grace N. 1994. Managing trace element deficiencies. N.Z. Pastoral Agriculture Research Institute. Palmerston North. N.Z.
- Gutzwiller A. 1998. Erythrocyte resistance to oxidative damage and leucocyte capacity to reduce nitroblue tetrazolium in selenium deficient cattle. *J Vet Med A* 45, 271-278.
- Himeno S, A Takekawa, N Imura. 1993. Species difference in hydroperoxide-scavenging enzymes with special reference to glutathione peroxidase in guinea pigs. *Comp Biochem Physiol* 104B: 27-31.
- Jiménez De Bagues MP, PH Elzer, SM Jones, JM Blasco, FM Enright, GG Shurig, AJ Winter. 1994. Vaccination with *Brucella abortus* mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *B. abortus*, *melitensis* and *ovis*. *Infect Immunol* 62, 4990-4996.
- Larson BL, JL Heary, JE Devery. 1980. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J Dairy Sci* 63, 665-671.
- Lee J, DG Masters, CL White, ND Grace, GJ Judson. 1999. Current issues in trace element nutrition of grazing livestock in Australia and New Zealand. *Aust J Agric Res* 50, 1341-1364.
- Leyán V, F Wittwer, PA Contreras, J Kruze. 2004. Concentración de inmunoglobulinas séricas y calostrales de vacas selenio-deficientes y en el suero sanguíneo de sus terneros. *Arch Med Vet* 36, 155-162.
- Leyán V, D Pesutic, G Schurig, F Wittwer, PA Contreras, J Kruze. 2005. Suplementación con selenio en vaquillas: Efecto de la respuesta inmune a las vacunas *Brucella abortus* cepa RB51 y toxoide tetánico. *Arch Med Vet* 37, 105-110.
- Nève J. 2000. New approaches to assess selenium status and requirement. *Nutr Rev* 58: 363-369.
- Nemec M, M Hidroglu, K Nielsen, J Prolux. 1990. Effect of vitamin E and selenium supplementation on some immune parameters following vaccination against brucellosis in cattle. *J Anim Sci* 68, 4303-4309.
- NRC, National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7<sup>th</sup> Ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Oliveira SC, N Soeurt, G Splitter. 2002. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 90, 417-24.
- Paglia DE, WN Valentine. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70, 158-159.
- Rotruck JT, AL Pope, HE Ganther, AB Swanson, DG Hafeman, WG Hoekstra. 1973. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590.
- Schurig G, RM Roop, T Bagchi. 1991. Biological properties

- of RB-51: A stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 2, 171-188
- Stowe HD, TH Herdt. 1992. Clinical assessment of selenium status of livestock. *J Anim Sci* 70, 3928-3933
- Swecker W, C Thatcher, D Eversole, D Blodgett, D Schurig. 1995. Effect of selenium supplementation on colostral IgG concentration in cows grazing selenium-deficient pastures and on postsuckle serum IgG concentration in their calves. *Am J Vet Res* 56, 450-453.
- Swecker W. 1997. Selenium and immune function in cattle. *Comp Cont Ed Pract Vet* 19, 248-254.
- Underwood EJ, NF Suttle. 1999. The Mineral Nutrition of Livestock. 3<sup>rd</sup> Ed. Pp 343-373. CAB International, Wallingford, Oxford, UK.
- Weitzel F, F Ursini, A Wendel. 1990. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta* 1036, 88-94.
- Wittwer F, P Araneda, A Ceballos, PA Contreras, M Andaur, H Böhmwald. 2002. Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre de bovinos a pastoreo de la IX Región, Chile, y su relación con la concentración de selenio en el forraje. *Arch Med Vet* 34, 49-57.
- Wyckoff JH. 2002. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 90, 395-415.