

# Actividad glutatión peroxidasa en vacas lecheras sin suplementar y suplementadas con selenio

Bianchini, G.<sup>1,2</sup>; Masso, R.J.<sup>2</sup>; Rinaudo, A.<sup>1,2</sup>; Marini, P.R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Facultad Cs.Veterinarias, Univ.Nac.Rosario, Argentina. <sup>2</sup>Investigador Centro Lat.Estad.Probl.Lecheras (CLEPL). <sup>3</sup>Carrera Investig.Cient.Univ.Nac. Rosario (CIC-UNR), Argentina. E-mail: pmarini@unr.edu.ar

## Resumen

**Bianchini, G.; Masso, R.J.; Rinaudo, A.; Marini, P.R.: Actividad glutatión peroxidasa en vacas lecheras sin suplementar y suplementadas con selenio. Rev. Vet. 31: 1, 28-32, 2020.**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles de la actividad glutatión-peroxidasa (GPX) en vacas lecheras suplementadas y sin suplementar con selenio (Se) intra-ruminal. Se determinó la actividad GPX de 96 vacas Holstein primíparas y múltíparas, clínicamente sanas, procedentes de un establecimiento comercial de la localidad de Centeno, Provincia de Santa Fe (Argentina). Se definieron dos categorías de reses según las determinaciones individuales de GPX tomando como valor de corte 130 U/gHb. Los animales de cada categoría se dividieron aleatoriamente en dos subgrupos, uno de los cuales recibió un bolo intraruminal de Se de larga acción (*Permatrace*®) mientras que el otro permaneció sin suplementar. A continuación, se efectuaron dos nuevas determinaciones de la actividad enzimática: preparto (entre los 30 y los 15 días previos al parto) y posparto (entre los 30 y los 45 posteriores al parto). El 35,4% de las vacas presentó valores de actividad de la enzima menores al valor de corte. Los animales con bajos valores basales de actividad GPX no suplementadas con bolos de Se, no modificaron significativamente los datos basales. En las vacas con bajos valores basales de actividad GPX y suplementadas con Se, se observó un aumento significativo de la actividad enzimática. Se concluye que una proporción importante de animales presenta baja actividad GPX, que los niveles de las enzimas se modifican según el momento de la evaluación en relación al tiempo del parto, y que la suplementación con bolos de Se intra-ruminal constituye una estrategia efectiva para aumentar la actividad de la enzima.

**Palabras clave:** vacas lecheras, preparto, selenio, bolo intra-ruminal.

## Abstract

**Bianchini, G.; Masso, R.J.; Rinaudo, A.; Marini, P.R. : Glutathione peroxidase activity in dairy cows with and without selenium supplementation. Rev. Vet. 31: 1, 28-32, 2020.**

The aim of this work was to evaluate glutathione peroxidase (GPX) activity levels in dairy cows supplemented and not supplemented with intra-ruminal selenium (Se) boluses. The GPX activity of 96 clinically healthy primiparous and multiparous Holstein dairy cows, from a commercial establishment in Centeno's town, Santa Fe Province (Argentina), was assessed. According to the individual GPX determinations, two categories of cows were defined taking 130 U/gHb as the cut value. The cows in each category were randomly divided in two subgroups, one of which received an intra-ruminal bolus of long-acting Se (*Permatrace*®) while the other remained unsupplemented. Next, two new enzymatic activity determinations were made: ante-partum (between 30 and 15 days before calving) and post-partum (between 30 and 45 after calving). The 35.4% of the cows presented enzyme activity values lower than the cut value. Cows with low basal values of GPX activity not supplemented with Se boluses did not significantly modify the basal values. In cows with low basal values of GPX activity and supplemented with Se, a significant increase in enzymatic activity was observed. It is concluded that a significant proportion of cows have low GPX activity, enzymatic activity levels are modified according to the moment of evaluation in relation to calving and that supplementation with intra-ruminal Se is an effective strategy to increase the enzyme activity.

**Key words:** dairy cows, ante-partum, selenium, intra-ruminal bolus.

## INTRODUCCIÓN

El selenio (Se) es un elemento esencial para el adecuado funcionamiento del organismo, debido a su condición de componente estructural de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) y de diferentes selenoproteínas involucradas -entre otras funciones- en la protección antioxidante. Es considerado uno de los *elementos traza* más controversiales por ser tóxico en dosis elevadas mientras que, paralelamente, su deficiencia representa un problema a nivel mundial <sup>19</sup>.

En los últimos años se ha demostrado que en determinados ámbitos geográficos, el cambio climático y el uso inadecuado de los suelos han provocado que estos últimos presenten una baja concentración del Se que deberían proveer a los forrajes y otros cultivos que crecen en ellos <sup>12</sup>.

El bajo contenido de Se en el forraje, producto de la baja densidad edáfica de este mineral, se traduce en una escasa ingesta del mismo por parte de los animales en pastoreo, con aumento de la susceptibilidad a enfermedades, respuesta asociada a la relación de las selenoproteínas y la respuesta inmune, con disminución de su desempeño productivo y/o reproductivo <sup>6</sup>.

La intensificación de las prácticas de manejo y el aumento de los establecimientos lecheros, incrementan el riesgo que los bovinos sufran enfermedades metabólico-nutricionales con el consecuente efecto negativo sobre la salud general y reproductiva del rodeo.

Los problemas metabólicos que se presentan en el post-parto de los animales lecheros son producto de un balance nutricional inadecuado, consecuencia de deficiencia o exceso de nutrientes, carencia de forrajes, cantidades no equilibradas de alimentos balanceados o cambios de la condición corporal durante el periodo de vaca seca.

Los minerales y las vitaminas desempeñan un papel clave en relación con las alteraciones metabólicas. A modo de ejemplo, los *minerales traza* -como el caso del selenio- son necesarios para la función reproductiva normal, la integridad del sistema inmune y la síntesis de hormonas, vitaminas y enzimas.

Para paliar el déficit de estos componentes de la dieta se dispone de diversas estrategias de intervención. En el caso del Se, puede mencionarse la suplementación basada en productos inyectables (como selenito de sodio y selenato de bario), los que obvian el problema de la metabolización a nivel ruminal, y la utilización de productos a base de selenio orgánico incorporado en levaduras, principalmente como selenio-metionina, que son absorbidos más eficientemente que las formas inorgánicas <sup>21</sup>.

Otra alternativa para la suplementación mineral es el uso de bolos intra-ruminales, los cuales presentan la ventaja de satisfacer los requerimientos de los animales luego de una única aplicación.

La GSH-Px es una enzima seleno-dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente re-

ductor el glutatión reducido (GSH). Se conoce que los L-OOH son tóxicos en los tejidos animales y además dan lugar a especies reactivas del oxígeno como los radicales peróxidos (L-OO<sup>•</sup>), que son compuestos inde-seables para los organismos vivos.

Esta enzima desempeña un importante papel en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos, como parte del sistema antioxidante del glutatión, por lo cual está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades <sup>7</sup>.

En la década de 1990 se determinó que las concentraciones hepáticas de Se aumentan entre los 120 y 220 días de gestación, para luego decaer entre los días 221 y 270, y que las concentraciones de Se sérico de vacas preñadas decaen durante los últimos 60 días de gestación <sup>1</sup>. Los bolos podrían ser una alternativa factible para asegurar la disponibilidad diaria de Se en los rumiantes, necesaria y prolongada en el tiempo <sup>9</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles de la actividad GSH-Px en vacas lecheras sin suplementar y suplementadas con bolos de selenio intra-ruminal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron 96 vacas lecheras Holstein, primíparas y multíparas, clínicamente sanas, procedentes de un establecimiento de la localidad de Centeno, Provincia de Santa Fe (32°18'00"S - 61°25'00"O), Argentina.

El sistema productivo correspondió a un rodeo totalmente encerrado, con un promedio de producción de 28 litros diarios por vaca, con suministro en el corral de ración conformada por: rollo de alfalfa 1,3 kg, maíz húmedo 4,8 kg, expeller de soja 2,2 kg, silo de maíz 5,2 kg, silo de soja 3,2 kg, semilla de algodón 1,3 kg y pastura de alfalfa 4,2 kg (datos en base seca).

Se obtuvieron muestras de sangre de cada animal por punción de la vena coccígea, con agujas y jeringas estériles. Cada muestra se colocó en tubos con heparina, los cuales se refrigeraron y se remitieron al Laboratorio Azul (Azul, Provincia de Buenos Aires) para realizar la determinación de la actividad de GSH-Px.

Las vacas se dividieron en dos categorías según las determinaciones individuales de GSH-Px tomando como valor de corte 130 U/gHb <sup>4</sup>. Los valores promedio de actividad de la enzima de los dos grupos así conformados se compararon con una prueba t de Student para datos independientes a fin de confirmar las diferencias entre ellos.

A continuación, y a los efectos de evaluar el resultado de la suplementación con Se sobre el valor de la actividad enzimática, las vacas de cada categoría se dividieron aleatoriamente en dos subgrupos, uno de los cuales no consumió suplementación y el otro recibió un bolo intra-ruminal de Se larga acción (*Permatrace*®).

Una vez suministrado el bolo de Se a las vacas del subgrupo correspondiente de cada categoría, se procedió a efectuar dos nuevas determinaciones de la actividad enzimática: una entre los 30 y los 15 días previos

al parto (pre-parto) y otra entre los 30 y los 45 días posteriores al parto (post-parto).

La modificación de los valores promedio de la actividad GSH-Px en cada uno de los cuatro grupos se evaluó con un análisis de la variancia para medidas repetidas, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## RESULTADOS

La Tabla 1 describe los valores de actividad enzimática de glutatión peroxidasa obtenidos en vacas Holstein preñadas y secas.

**Tabla 1.** Valores de GSH-Px.

N° total de vacas	96
valor mínimo (U/gHb)	11,0
primer cuartil (U/gHb)	107,0
mediana (U/gHb)	260,0
tercer cuartil (U/gHb)	459,5
valor máximo (U/gHb)	629,0
promedio (U/gHb)	281,4
desvío estándar (U/gHb)	181,1
error estándar (U/gHb)	18,5
coeficiente variación (%)	64,4

Se observó una gran dispersión de los valores de GSH-Px a juzgar por el valor del coeficiente de variación. El 35,4% de las vacas evaluadas (34/96) presentó valores de actividad de la enzima menores al valor de corte de 130 U/gHb. Las vacas con GSH-Px < 130 (categoría 1, n = 34) presentaron valores (media aritmética  $\pm$  error estándar) de actividad enzimática de  $85,5 \pm 5,36$  U/gHb, significativamente diferentes ( $t = 13,2$ ;  $p < 0,0001$ ) a los de las vacas con GPX > 130 (categoría 2; n = 76;  $388,8 \pm 16,78$  U/gHb).

Los dos subgrupos (sin suplementar y suplementados con Se) dentro de cada categoría (por debajo y por encima del valor de corte), no difirieron significativamente en los valores basales de actividad enzimática (Tablas 2 y 3).

**Tabla 2.** Glutatión peroxidasa en vacas con valores basales inferiores al valor de corte, con y sin administración de selenio intra-ruminal.

momento	GSH-Px < 130 SS con Se (n=17)	GSH-Px < 130 SU con Se (n=17)
basal	$91,5 \pm 5,96$ a	$79,6 \pm 8,87$ a
pre-parto	$108,5 \pm 12,17$ a	$149,4 \pm 17,38$ b
post-parto	$127,8 \pm 28,25$ a	$286,6 \pm 18,89$ c

SS: sin suplementar. SU: suplementadas. a,b,c: Valores con diferente letra difieren al menos al 5% para las comparaciones entre momentos, dentro de grupo.

La Tabla 2 muestra que las vacas con actividad enzimática inferior al valor de corte, que no recibieron bolo intraruminal de Se, no modificaron significativamente el nivel basal de dicha actividad ( $F = 1,827$ ;  $p = 0,194$ ) aun cuando se observó una tendencia creciente en el valor promedio de la misma de 18,6% entre el valor basal y el valor pre-parto, de 17,8% entre el valor pre-parto y el correspondiente al post-parto, con un incremento acumulado basal-post-parto del 39,7%.

Por su parte, las vacas de este grupo, suplementadas con Se, presentaron un aumento consistente y significativo ( $F = 51,4$ ;  $p < 0,0001$ ) de la actividad enzimática del 87,7% entre los valores basal y pre-parto, del 91,8% entre antes y después del parto, con un incremento acumulado final del 260,1%.

**Tabla 3.** Glutatión peroxidasa en vacas con valores basales superiores al valor de corte, con y sin administración de Se intra-ruminal

momento	GSH-Px > 130 sin supl.c/Se (n=31)	GSH-Px > 130 suplem.c/Se (n=31)
basal	$353,2 \pm 25,63$ a	$424,4 \pm 20,10$ ab
pre-parto	$323,5 \pm 20,72$ b	$408,3 \pm 20,09$ a
post-parto	$341,5 \pm 25,21$ ab	$440,7 \pm 16,53$ b

a,b: valores con diferente letra difieren al menos al 5% para las comparaciones entre momentos, dentro de grupo.

En la Tabla 3 se observa que las vacas con valores basales de actividad GSH-Px superiores al valor de corte y no suplementadas, experimentaron modificaciones significativas de la actividad enzimática en el período evaluado ( $F = 3,756$ ;  $p = 0,032$ ), en tanto disminuyeron un 8,4% la actividad enzimática basal en el pre-parto y la aumentaron un 5,6% entre el pre y el post-parto, con una resultante final de 3,3% de disminución entre el valor basal y el valor post-parto, que no fue estadísticamente significativa.

Por su parte, aquellas vacas del mismo grupo que recibieron bolo de Se intra-ruminal presentaron una dinámica similar ( $F = 7,235$ ;  $p = 0,002$ ) con disminución de la actividad enzimática basal en el pre-parto (3,8%) y aumento de la misma entre el pre-parto y el post-parto (7,9%), con valores finales que, si bien mayores (3,8%), no difirieron significativamente del registrado a nivel basal.

## DISCUSIÓN

La intensificación de los sistemas productivos y la continua presión de selección genética, han contribuido a aumentar la producción de leche por animal. Paralelamente, los bovinos se han visto sometidos a mayores exigencias metabólicas con un aumento concomitante de la predisposición a desarrollar las denominadas enfermedades de la producción<sup>26</sup>.

La etapa de transición representa un periodo crucial para definir la lactancia y la atención sobre el post-parto<sup>8</sup>. El 60% de las muertes durante el post-parto ocurren en las dos primeras semanas de lactancia, razón por la cual la transición de la vaca lechera de preñada no lactante a preñada lactante ha sido definida como una experiencia difícil y riesgosa<sup>10</sup>.

Un aspecto clave para mejorar el desempeño futuro de las vacas en los establecimientos lecheros, es trabajar la etapa de transición desde distintos enfoques. En el marco de esta propuesta se identificaron animales con actividad sanguínea de GSH-Px por encima y por debajo del valor umbral de 101-130 U/g Hb definido como marginal<sup>4</sup>.

Los valores obtenidos en el relevamiento inicial efectuado sobre la totalidad de las vacas, fueron similares a los registrados por otros autores que concuerdan en señalar una actividad promedio de GSH-Px para vacas adultas adecuada en tanto supera los valores considerados bajos o marginales, pero variable, poniendo de relieve una situación habitual en algunos rodeos<sup>2,5,6,11</sup>.

Dentro de este contexto, un resultado a destacar fue que el 35,4% de las vacas evaluadas (34/96) presentó bajos valores de actividad de la enzima, dato que pone en evidencia que pese a las mejoras introducidas en el manejo de la dieta de las vacas actuales de elevada producción<sup>14,27</sup> y a que, en promedio, los valores de actividad glutatión peroxidasa se encuentran por encima del valor de corte, existe aún una proporción importante de las mismas que carecen del aporte diario y necesario de Se.

Los resultados obtenidos al suplementar con Se coinciden con los informados por autores que observaron una respuesta favorable luego de la aplicación de bolos intra-ruminales a vacas lecheras en el pre-parto<sup>15</sup>, como así también con trabajos anteriores<sup>3,16,17,21,24,25</sup>, en los cuales los animales tratados con bolos intra-ruminales de Se en el pre-parto aumentaron los valores sanguíneos de glutatión peroxidasa con posterioridad a la suplementación y hasta el final del estudio, manteniéndose los mismos por encima de aquellos considerados como adecuados.

El aumento de la actividad glutatión-peroxidasa se presenta -en promedio- 30 días luego de la suplementación, retraso que se explica por el hecho que el aumento de la concentración orgánica de Se no necesariamente conduce a la síntesis inmediata de la enzima, proceso que requiere de un periodo de latencia para que el Se sea incorporado como GSH-Px en los eritrocitos.

Mientras el grupo sin suplementación (bolo) mantuvo durante el ensayo la misma actividad sanguínea de GSH-Px con valores bajos o marginales, el aumento en la actividad sanguínea de GSH-Px, posterior a la suplementación con Se, indica que la forma empleada y la cantidad de Se liberada por los bolos intra-ruminales fue la adecuada para los animales con las características señaladas y bajo las condiciones de este estudio.

Los resultados confirman que la utilización del Se intra-ruminal aumenta la actividad de GSH-Px, lo que

posibilita mantener valores aceptables de la misma en las vacas lecheras. Se dispone de evidencia que indica que los valores de la actividad de GSH-Px disminuyen una semana después del parto<sup>18</sup>, hecho que podría explicarse por el aumento del estrés oxidativo post-parto<sup>20,22</sup>.

El estrés oxidativo se iniciaría antes o durante el período de transición de menos de 21 días. Datos similares fueron obtenidos por otros autores que registraron una disminución de GSH-Px en sangre en vacas lecheras entre uno y siete días después del parto como pérdida del control homeostático en el período posparto<sup>13</sup>. Estos resultados coincidirían en parte con los obtenidos con las vacas categoría 2 de este trabajo, pero no con los de las vacas de categoría 1, en las cuales los valores de actividad enzimática aumentaron en forma consistentes desde la primera toma hasta el posparto.

En las vacas lecheras existe una relación entre los cambios fisiológicos asociados al parto y la pérdida en general del potencial anti-oxidante<sup>23</sup>, con ocurrencia de cambios significativos en los indicadores de estrés oxidativo y el estado anti-oxidante durante el peri-parto y el post-parto<sup>18</sup>, identificándose a la etapa post-parto como el momento de mayor estrés oxidativo y baja defensa antioxidante, lo que puede contribuir a la incidencia de muchas enfermedades metabólicas. Monitorear los niveles de GSH-Px en vacas durante el período de transición permitiría reducir la incidencia de enfermedades en este período.

Se concluye que una proporción importante de vacas presenta baja actividad glutatión-peroxidasa, que los niveles de actividad enzimática se modifican según el momento de la evaluación en relación al momento del parto, y que la suplementación con bolos de Se intra-ruminal constituye una estrategia efectiva para aumentar la actividad de la enzima.

**Agradecimiento.** A la Cooperativa de Tamberos y Agrícola Ganadera Ltd., Centeno, Provincia de Santa Fe, Argentina, por facilitar los animales para realizar el ensayo.

## REFERENCIAS

1. **Abdelrahman M, Kinkaid R.** 1993. Effect of selenium supplementation of cows on maternal transfer of selenium to fetal and new born calves. *J Dairy Sci* 78: 625-630.
2. **Backall KA, Scholz RW.** 1979. Reference values for a field test to estimate inadequate glutathione peroxidase activity and selenium status in the blood of cattle. *Am J Vet Res* 40: 733-738.
3. **Ceballos MA.** 1996. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa como indicador del estado metabólico nutricional del Se en rebaños lecheros. *Tesis, Magister Ciencias, Mención Salud Animal.* Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
4. **Ceballos A, Wittwer F.** 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch Med Vet* 28: 5-18.
5. **Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Böhmwald HL.** 1998. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en re-

- baños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. *Arch Med Vet* 30: 13-22.
6. **Ceballos A et al.** 2009. Meta-analysis of the effect of oral selenium supplementation on milk selenium concentration in cattle. *J Dairy Sci* 92: 324-342.
  7. **Cisneros PE, Pupo BJ, Céspedes ME.** 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 16: 10-15.
  8. **Corbellini C.** 2008. Como influye el manejo de la transición en la mortalidad periparto de la vaca lechera. *Conférence Mercoláctea*, San Francisco, Córdoba, Argentina.
  9. **Delraza OE et al.** 2002. Uso de bolos para suplementar selenio a vacas lecheras. *Memorias XXX Reunión Anual Asoc. Mex. Prod. Anim.*, Guadalajara, México, p.149-152.
  10. **Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G.** 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 72: 68-78.
  11. **Enjalber F, Lebreton P, Salat O, Schelcher F.** 1999. Effects of pre- or post-partum selenium supplementation on selenium status of beef cows and their calves. *J Anim Sci* 77: 223-229.
  12. **European Environment Agency.** 2015. *El suelo y el cambio climático*. Disponible en-<https://www.eea.europa.eu/es/senales/senales-2015/articulos/el-suelo-y-el-cambio-climatico>.
  13. **Festila I et al.** 2012. Evaluation of oxidative stress in dairy cows through antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD). *Bulletin UASVM Anim Sci Biotech* 69: 107-110.
  14. **Ghiasi H, Honarvar M.** 2015. Genetic and phenotypic trends of fertility traits in iranian Holstein cows. *Iranian J Appl Anim Sci (IJAS)* 6: 53-58.
  15. **Glauber CE, Recoula A, Debernardi A.** 2010. Efecto de bolos intraruminales con aporte vitamínico-mineral sobre la respuesta productiva peripartal en vacas lecheras. *Vet Arg* 27 (270): 1-7.
  16. **Hoffman C, Rivinus B, Swanson L.** 1978. Effect of intramuscular administration of selenium and vitamin E in dairy heifers on erythrocyte glutathione peroxidase activity and blood selenium levels. *J Anim Sci* 47: 192-197.
  17. **Knight SA, Sunde RA.** 1988. Effect of selenium repletion on glutathione-peroxidase protein level in rat liver. *J Nutr* 118: 853-858.
  18. **Konvicná J et al.** 2015. Oxidative stress and antioxidant status in dairy cows during prepartal and postpartal periods. *Acta Vet Brno* 84: 133-140.
  19. **Lyons MP, Papazyan TT, Surai PF.** 2007. Selenium in food chain and animal nutrition: Lessons from nature. *Asian-Aust J Anim Sci* 20: 1135-1155.
  20. **Miller JK, Brzezinska SE, Madsen FC.** 1993. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci* 76: 2812-2823.
  21. **Neumann J et al.** 2016. Efecto de la suplementación preparto con selenio levadura oral o selenato de bario parenteral en las concentraciones sanguíneas de selenio en vacas lecheras y sus crías. *Arch Med Vet* 48: 37-42.
  22. **Pereira B et al.** 1998. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adreno-demedullated rats. *Braz J Med Biol Res* 31: 827-833.
  23. **Sordillo LM et al.** 2007. Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *J Dairy Sci* 90: 1186-1192.
  24. **Thompson KG, Fraser AJ, Harrop BM, Kirk JA.** 1980. Glutathione peroxidase activity in bovine serum and erythrocytes in relation to selenium concentrations of blood, serum and liver. *Res Vet Sci* 28: 3-6.
  25. **Thompson KG et al.** 1981. Glutathione peroxidase activity and selenium concentration in bovine blood and liver as indicators of dietary selenium intake. *N Z Vet J* 29: 3-6.
  26. **Wittwer F.** 2012. *Manual de patología clínica veterinaria*, Imprenta América, Valdivia (Chile), 200 p.
  27. **Zink V, Lassen J, Štípková M.** 2012. Genetic parameters for female fertility and milk production traits in first-parity Czech Holstein cows. *Czech J Anim Sci* 57: 108-114.