

Efecto del selenato de bario inyectable sobre la actividad de Glutathion peroxidasa en caballos a pastoreo

The effect of injectable barium selenate on the Glutathion peroxidase activity of horses on pastures

O. ARAYA, M.V., Ph.D.; R. URZUA, M.V.; H. BUSTAMANTE, M.V.

Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

SUMMARY

The aims of this study was to measure the response to i.m. injection of barium selenate (Deposel) using erythrocytic glutathion peroxidase (GSH-Px) activity as indicator of selenium status. Local tissue reaction in the injection site was also measured.

Fourteen Chilean Criollo horses, from two to twenty years old, low erythrocytic GSH-Px activity and under pasture feeding were used. They were divided into two groups: A (n=8) received a single dose of 0.5 mg/kg bw of barium selenate and B (n=6) received a placebo. Heparinized blood was obtained at the beginning of experiment and at 30, 60, 90 and 180 days after treatment. Local tissue reaction was evaluated according to reaction size, discomfort on palpation, local temperature and lameness.

Erythrocytic GSH-Px activity of the A group incremented thirty days after treatment, reaching the minimum value of the reference range (> 100 mU/mgHb). However, this increment was not statistically significant ($p > 0.05$), but difference between treated (A) and non treated (B) groups were statistically significant ($p < 0.05$). GSH-Px activity incremented significantly 60, 90 and 180 days after treatment in the treated group, and differences between treated and non treated groups were also significantly ($p < 0.05$) at these time.

Treated horses showed only barely discomfort on palpation and a light local temperature elevation at injection site, but both of them disappeared four days after treatment.

It can be concluded that a single i.m. injection of 0.5 mg/kg bw of barium selenate, will increment and maintain erythrocytic GSH-Px activity in the reference range for at least 180 days in horses. Besides, i.m. injection of barium selenate does not produce adverse reactions clinically detected at the injection site.

Palabras claves: equino, selenio, esteatosis, selenato de bario.

Key words: equine, selenium, steatosis, barium selenate.

INTRODUCCIÓN

El Selenio (Se), es uno de los minerales esenciales para el mantenimiento y desarrollo de las funciones del organismo animal (López Alonso y col., 1997). El interés en este mineral comenzó con el conocimiento de sus efectos tóxicos, responsabilizándose de la llamada Enfermedad del alcali o vértigo ciego (Franke,

1934). Sin embargo, el verdadero papel de este elemento no se conoció hasta 1973, cuando Rotruck y col. descubrieron su función protectora contra el daño oxidativo, como componente de la enzima glutathion peroxidasa (GSH-Px, E.C.1.11.1.9). Esta enzima participa activamente en los procesos de óxido-reducción, catalizando las reacciones que destruyen los peróxidos de ácidos grasos o hidroperóxidos que se generan en el organismo (López Alonso y col., 1997) y ella contiene aproximadamente el 75% del Se sanguíneo, encontrándose en el interior de los

eritrocitos a los que se incorpora sólo durante la eritropoyesis (Oh y col., 1974).

Existe una alta correlación ($r=0.94$) entre el contenido de Se sanguíneo y la actividad de GSH-Px en equinos, por lo que la determinación de esta enzima permite un adecuado diagnóstico del balance de Se en los animales (Maylin y col., 1980).

En situaciones donde ocurre una mayor actividad metabólica, tales como crecimiento, ejercicio, procesos inflamatorios y estrés se produce una mayor demanda tisular de oxígeno, metabolizándose parte de él por la vía univalente, generándose una gran cantidad de radicales libres nocivos. Si la carga de estos últimos supera las defensas antioxidantes, se producen lesiones tisulares al fijarse a los componentes estructurales de la célula, tales como ácidos nucleicos (con producción de tumores y enfermedades autoinmunes); carbohidratos (en patologías asociadas a cataratas y enfermedades reumáticas) y lípidos, desencadenando una peroxidación lipídica responsable de la ruptura de las membranas celulares (López Alonso y col., 1997).

Taylor y col. (1988), indican que el tipo de alteraciones anteriormente señaladas desencadenan una serie de patologías en animales con bajas concentraciones de Se, entre las cuales resaltan la miodegeneración nutricional, una enfermedad degenerativa no inflamatoria que afecta la musculatura esquelética y cardíaca de caballos con bajos niveles de Se y/o vitamina E (Lofstedt, 1997) y la esteatosis o enfermedad de la grasa amarilla. La miodegeneración fue descubierta por Jones y Reed (1948) y desde entonces ha sido diagnosticada en numerosos países, tales como Holanda, Inglaterra, Finlandia, Alemania, Polonia, Canadá, Australia, Nueva Zelanda (Ronéus y Jónsson, 1984) y Chile (Araya y Vits, 1998). La esteatosis afecta principalmente a potrillos menores de dos meses, aunque también se han descrito casos en animales mayores (Foreman y col., 1986; Taylor y col., 1988; Ceballos y col., 1996).

La prevención de éstos cuadros se realiza mediante la suplementación con selenio, siendo muy importante controlar las yeguas gestantes,

especialmente aquellas que pastan en zonas deficientes en Se (Ceballos y col., 1996).

Las diferentes formas químicas de Se suministradas interfieren en su metabolismo, siendo las sales de selenito o selenato más absorbibles para el organismo que el selenio elemental y el selenido (Ceballos y Wittwer, 1996).

La mayoría de los productos comerciales para suplementación contienen selenito de sodio; sal con la que se requiere de un largo y constante tiempo de administración, a pesar de lo cual no siempre se obtienen buenos resultados (Witchtel y col., 1998), observándose además efectos colaterales no deseados (Moore y Khon, 1991). El empleo de selenato de bario por vía i.m. ha demostrado incrementar la concentración de selenio en sangre por un largo período de tiempo en caballos (Witchtel y col., 1998).

El presente trabajo tuvo por finalidad evaluar el efecto de la administración parenteral de selenato de bario, aplicado en dosis única a caballos selenio deficientes, mediante determinación de la actividad de GSH-Px eritrocítica y además, estimar el grado de reacción tisular local provocado por la aplicación intramuscular del fármaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 14 caballos Criollo chileno de ambos sexos, de dos a veinte años de edad, con una baja actividad de GSH-Px eritrocítica. Los animales pertenecían a dos predios con antecedentes previos de esteatosis y miodegeneración nutricional, ubicados en las cercanías de la ciudad de Los Lagos. El estudio se inició a fines del mes de mayo y todos los caballos se encontraban bajo régimen de pastoreo directo desde al menos un año en praderas naturales mejoradas con un alto porcentaje de ballica (*L. perenne*).

Se establecieron en forma aleatoria dos grupos: Grupo A (tratados), conformado por ocho caballos y Grupo B (control), formado por los seis restantes. Los animales fueron pesados, para posteriormente aplicar selenato de bario al grupo A, en dosis de 1 ml/100 kg de peso vivo, vía i.m. profunda en el músculo semitendinoso izquierdo

a cuatro caballos y en el músculo glúteo medio izquierdo a los cuatro restantes. Los animales del grupo B, fueron inyectados del mismo modo con agua bidestilada (1 ml/100 kg de peso vivo).

Se utilizó un medicamento formulado en base a selenato de bario (Deposel®) a razón de 50 mg/ml en suspensión y de liberación lenta. La aplicación del producto se realizó con un dosificador diseñado para tal fin y agujas estériles calibre 14G/11/2 pulgada.

Se efectuó el examen clínico de aparato músculo-esquelético a los 14 animales experimentales, con el objeto de detectar signos de deficiencia de selenio, antes de la aplicación del producto, 24 horas después de la aplicación y al cuarto, séptimo y décimo día y finalmente, a los 30, 60, 90 y 180 días.

Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada de cada caballo mediante venopunción yugular al inicio de la experiencia (día 0), y luego a los 30, 60, 90 y 180 días post tratamiento. Estas fueron llevadas al laboratorio dentro de las primeras cuatro horas posteriores a la recolección, diluidas y congeladas a -25°C hasta su análisis.

La actividad de GSH-Px eritrocítica se determinó mediante una técnica cinética NADPH – dependiente (Paglia y Valentine, 1967) usando un reactivo comercial*. Los análisis de hemoglobina se realizaron en un fotómetro semiautomático Hitachi 4020.

Evaluación reacción tisular en punto de inyección. La reacción tisular fue evaluada de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 1.

Análisis estadístico. Se determinó media aritmética y la desviación estándar (D.E.) por grupos y la significancia de las diferencias entre medias dentro de cada grupo se estableció mediante análisis de varianza de Kruskal Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn ($p < 0.05$). Para la determinación de la significancia entre grupos se utilizó el test de Mann Whitney ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Examen clínico. Al inicio de la experiencia, seis caballos del grupo A presentaban signos clínicos de deficiencia de Se, caracterizados principalmente por marcha envarada y aumento de volumen a nivel del ligamento nugal (figura 1). En el control del décimo día post tratamiento se observó una notable mejoría de estos signos, normalizándose en todos ellos la marcha a los 30 días post tratamiento.

En cuanto a la reacción local, en todos los animales del grupo tratado se presentó una leve molestia a la palpación y un leve aumento de temperatura local, desapareciendo ambas reacciones al cuarto día post tratamiento. No hubo diferencia entre ambos sitios de aplicación. De la misma forma, no se observó un aumento de tamaño palpable en el área inyectada, como tampoco claudicación en ninguno de los animales.

CUADRO 1. Pauta para evaluar la reacción tisular posterior a la aplicación intramuscular de selenato de bario en caballos.

Method of assessing local tisular reaction due to barium selenate injection in horses

Grado	Tamaño de la reacción
0	Reacción no palpable
1	Detectable sólo a la palpación
2	Detectable a la inspección minuciosa sin palpación
3	Reacción obvia a una distancia de dos metros
4	Abscedación o celulitis
Grado	Dolor a la palpación
0	No hay dolor
1	Leve molestia
2	Dolor moderado
3	Severo dolor
Grado	Claudicación
0	No hay
1	Leve
2	Moderada
3	Grave
4	Muy grave
Grado	Temperatura local
0	No hay aumento
1	Aumento leve
2	Aumento marcado

® Laboratorio Novartis. Nueva Zelanda.

* Ransel (R). Radox Laboratories Ltd. U.K.



**FIGURA 1. Aumento de volumen a nivel de ligamento nuchal en una yegua con esteatosis.
Tick nuchal ligament in a mare with steatosis.**

Determinación de la actividad de GSH-Px eritrocítica. La actividad de GSH-Px eritrocítica del grupo tratado se incrementó a los treinta días post tratamiento, alcanzando en promedio el valor mínimo del rango de referencia establecido para el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Universidad Austral de Chile (>100 mU/mgHb), sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas (cuadro 1) con los valores basales (día = 0). No obstante, en este mismo muestreo existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo control (figura 2). A los 60, 90 y 180

días post tratamiento, se observó incrementos significativos ($p < 0.05$) en la actividad enzimática

del grupo tratado (cuadro 1), existiendo también en ambos muestreos diferencias respecto del grupo control (figura 2).

En el grupo control no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de GSH-Px eritrocítica a los 30, 60, 90 y 180 días respecto del día de aplicación del selenato, como tampoco se determinó aumentos o disminuciones entre un muestreo y el siguiente (cuadro 1).

Al comienzo de la experiencia, a pesar de encontrarse ambos grupos bajo el mínimo del rango de referencia, existían diferencias estadísticamente significativas entre ellos, siendo mayor el valor de GSH-Px en el grupo control (figura 2). Sin embargo, al día 30, esta situación

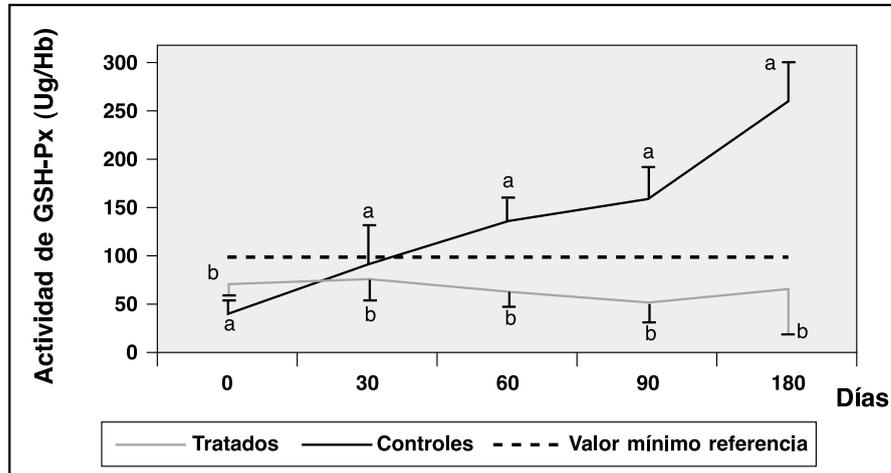
CUADRO 1. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en la actividad de GSH-Px en caballos tratados con selenato de bario y controles dentro de cada grupo para cada muestreo.

Mean values \pm Standard deviation and statistical significance in horses treated with barium selenate and controls.

	0 días	30 días	60 días	90 días	180 días	Signif.
Tratados (A)	40.7 \pm 13.1 a	106.1 \pm 21.9 ab	138.5 \pm 24.9 b	161.8 \pm 31.9 b	262.4 \pm 39.9 b	$P < 0.05$
Control (B)	72.3 \pm 13.2 a	79.3 \pm 23.4 a	63.8 \pm 15.8 a	54.0 \pm 21.2 a	68.7 \pm 49.7 a	n.s*

Letras diferentes en sentido horizontal, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos.

* Sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).



Letras diferentes en sentido vertical, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

FIGURA 2. Cambios en actividad promedio de GSH-Px eritrocítica en caballos tratados con una dosis de selenato de bario i.m. y controles .

Changes in mean erythrocytic glutathione peroxidase activity in horses treated with a single i.m. injection of barium selenate and controls .

se invirtió, pasando a ser mayor el promedio de GSH-Px del grupo tratado, existiendo diferencias respecto del grupo control (figura 2).

Al analizar las variaciones individuales experimentadas en el grupo tratado, se aprecia que el 50% de los caballos alcanza el valor mínimo de referencia a los 30 días y el 100% lo hace a los 60 días. De la misma forma, el 100% de los animales de este grupo experimenta un aumento en la actividad de GSH-Px entre muestreos.

DISCUSION

La deficiencia de Se predispone a la presentación de signos de miodegeneración y/o esteatosis, condición manifestada en seis de los ocho caballos del grupo tratado. Además, estos seis animales presentaban la actividad más baja de GSH-Px.

El selenato de bario aplicado en caballos por vía i.m. en dosis única de 0.5 mg/kg de peso vivo incrementó la actividad de GSH-Px eritrocítica en el grupo tratado respecto del grupo control,

concordando este resultado con lo expresado por Witchel y col. (1998), quienes determinaron un incremento en las concentraciones séricas de Se durante 365 días, inyectando selenato de bario en caballos por vía i.m. en dosis de 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mg/kg de peso vivo. Según estos autores, la concentración de Se sanguíneo alcanzó el valor mínimo de referencia utilizando dosis de 0.5 mg/kg a los 30 días post tratamiento, situación igualmente observada en el grupo tratado en el presente estudio en relación a la actividad de GSH-Px eritrocítica, similitud que se explicaría principalmente debido a que a los 30 días post aplicación existiría una renovación bastante considerable de eritrocitos, los que habrían incorporado selenio durante la eritropoyesis, lo cual se reflejaría en el incremento en la actividad de GSH-Px eritrocítica en ese muestreo. Por otra parte, con el transcurrir de los días aumenta aún más el número de eritrocitos que han incorporado selenio (Moore y Kohn, 1991), lo que explicaría las diferencias significativas, observadas a los 60 días post tratamiento en relación a los valores

basales. De la misma forma, al ser el producto de liberación lenta proporcionaría Se hasta que se produzca el recambio de la totalidad de la población de glóbulos rojos (Maas y col., 1990). Esto concuerda con lo encontrado en el presente estudio, en que se observó un aumento en la actividad de GSH-Px en cada muestreo en el grupo tratado, alcanzándose los valores más altos en el último de ellos (180 días).

El grupo control no experimentó mayores variaciones en la actividad de GSH-Px, siendo incluso al día 90 el valor promedio de GSH-Px más bajo que al día 0; condición que se explicaría por la época del año en que se realizó el estudio (otoño-invierno), existiendo en ésta una menor disponibilidad de pradera conforme avanza el invierno. Según Rioseco (2001), la actividad de GSH-Px eritrocítica en caballos Criollo chilenos observada en la época de otoño es inferior a la de la primavera.

Los resultados obtenidos en esta experiencia concuerdan con lo descrito por Witchel y col. (1998), en el sentido de que la suplementación con Se en forma de selenato de bario presentaría ventajas sobre el selenito de sodio, puesto que en todos los caballos tratados con Deposel se incrementó la actividad de GSH-Px, alcanzándose el rango mínimo de referencia en forma bastante rápida, valores que se mantuvieron elevados hasta el último muestreo a los 180 días.

No se observó en ningún caso reacciones inflamatorias clínicamente importantes en el punto de inyección, ni se determinaron diferencias entre ambos lugares respecto a la reacción tisular. Sin embargo, es más fácil y más seguro para el operador la aplicación en el músculo glúteo medio; no obstante, en caso de una infección en que se requiera drenaje, es más fácil realizarlo en el músculo semitendinoso (Moore y Khon, 1991). A diferencia de Witchel y col. (1998), quienes aplicaron el producto en los músculos pectorales, en esta experiencia no se observaron reacciones inflamatorias, como tampoco edema ni infecciones. En la presente experiencia sólo se observó una leve molestia a la palpación y leve aumento de temperatura local, desapareciendo éstas al cuarto día post

tratamiento. Este hecho, podría deberse al uso del dosificador adecuado y al calibre de la aguja (14 G/1,5”), inusual en caballos, lo que evitaría una presión extra sobre el tejido, y por ende una menor destrucción de tejidos localmente.

Se puede concluir que el selenato de bario aplicado a caballos selenio deficientes, vía intramuscular en dosis única de 0.5 mg/kg, incrementó y mantuvo la actividad de GSH-Px eritrocítica dentro del rango de referencia, al menos por 180 días posteriores a la suplementación. Además, la aplicación del producto por vía intramuscular en caballos no produjo reacciones tisulares adversas clínicamente detectables en el punto de inyección.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue medir en caballos selenio deficientes la respuesta a la aplicación i.m. de una dosis de selenato de bario, mediante determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) eritrocítica y el grado de reacción tisular local provocado en el punto de inyección.

Como material biológico se utilizaron 14 caballos Criollo chileno, de ambos sexos, de dos a veinte años de edad, todos selenio deficientes y alimentados bajo régimen de pastoreo directo. Se dividieron en dos grupos: A tratado (n=8) con selenato de bario en dosis de 0.5 mg/kg de peso vivo y grupo B control (n=6). El grupo A recibió selenato de bario en dosis de 1 ml/100 kg de peso vivo, vía i.m. profunda en el músculo semitendinoso izquierdo en cuatro caballos y en el músculo glúteo medio izquierdo en los cuatro restantes. Los animales del grupo B, fueron inyectados del mismo modo con agua bidestilada (1 ml/100 kg de peso vivo).

Se tomaron muestras de sangre heparinizada al comienzo de la experiencia y a los 30, 60, 90 y 180 días post tratamiento a todos los animales. La reacción tisular local fue evaluada según el tamaño de la reacción, dolor a la palpación, temperatura local y claudicación.

A los 30 días post tratamiento, la actividad de GSH-Px eritrocítica del grupo tratado se

incrementó, alcanzando en promedio el valor mínimo del rango de referencia, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con los valores basales. No obstante, en este mismo muestreo, existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto del grupo control. A los 60, 90 y 180 días post tratamiento, se observaron incrementos significativos ($p < 0.05$) en la actividad enzimática del grupo tratado; existiendo también diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en estos muestreos respecto del grupo control.

No se observaron reacciones adversas de importancia en el punto de aplicación, salvo una leve molestia a la palpación y un aumento de temperatura local en los tratados, desapareciendo ambas reacciones al cuarto día post tratamiento.

Se concluye que el selenato de bario aplicado a caballos selenio deficientes, vía i.m. en dosis única de 0.5 mg/kg, logra incrementar y mantener la actividad de GSH-Px eritrocítica dentro del rango de referencia al menos por 180 días posteriores al tratamiento. Además, su aplicación intramuscular no produce reacciones adversas clínicamente detectables en el punto de inyección.

BIBLIOGRAFIA

- ARAYA, O. L. VITS. 1998. Esteatosis en caballos en el sur de Chile. Tercer coloquio internacional sobre équidos de trabajo. *Div. Educ. Cont., México*. pp:329-332.
- CEBALLOS, A., O. ARAYA, E. PAREDES. 1996. Aspectos clínico-patológicos de la esteatosis del equino: descripción de un caso. *Arch. Med. Vet.* 28: 125-130.
- CEBALLOS, M. A., F. G. WITWER. 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 28: 5-18.
- FOREMAN, J. H., K. POTTER, W. BAYLY, D. LIGGITT. 1986. Generalized steatitis associated with selenium deficiency and normal vitamin E status in a foal. *JAVMA*. 189: 83 – 87.
- FRANKE, K. W. 1934. A new toxicant occurring naturally in certain samples of plants foodstuffs. I. Results obtained in preliminary feeding trials. *J. Nutr.* 8: 597-598.
- JONES, T. C., W. O. REED. 1948. White muscle disease. *JAVMA*. 113:170.
- LOFSTEDT, J. 1997. White muscle disease of foals. *Equine Pract.* 13: 169-183.
- LOPEZ ALONSO, M., M. MIRANDA, J. HERNANDEZ, C. CASTILLO, J. L. BENEDITO. 1997. Glutation peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 29:171-180.
- MASS, J., S. PARISH, D. HODGSON. 1990. Nutritional myodegeneration. *Large Anim. Int. Med.* 1352-1357.
- MAYLIN, G. A., D. RUBIN, D. LEIN. 1980. Selenium and vitamin E in horses. *Cornell Vet.* 70:272-289.
- MOORE, R. M., C. W. KOHN. 1991. Nutritional Muscular Dystrophy in Foals. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 13:343-349.
- OH, S., H. E. GANTHER, W. G. HOEKSTRA. 1974. Selenium as a component of glutation peroxidase isolated from ovine eritrocites. *Biochemistry.* 13 : 1825-1829.
- PAGLIA, D. E., VALENTINE, W. N. 1967. Studies on the quantitative and cualitative characterization of erythrocyte glutation peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- RIOSECO, M. 2001. Actividad de GSH-Px en caballos criollos y su respuesta a una suplementación con selenio. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- RONEUS, B.; L. JONSSON. 1984. Muscular dystrophy in foals. *Nord. Vet. Med. A.* 31:441-453
- ROTRUCK, J.T., A. L. POPE, H. E. GANTHER, A., B. SWANSON, D.G. HAFEMAN, W. G. HOEKSTRA. 1973. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- TAYLOR, F. G., T. S. MAIR, P. J. BROWN. 1988. Generalised steatitis in a adult pony mare. *Vet. Rec.* 122: 349-351.
- WITCHEL, J. J., N. D. GRACE, E. C. FIRTH. 1998. The effect of inyectable barium selenate on the selenium status of horses on pasture. *N. Zealand Vet. J.* 46: 186-190.

