

ACTIVIDAD DE GLUTATIÓN PEROXIDASA EN BOVINOS LECHEROS A PASTOREO CORRELACIONADA CON LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA Y PLASMÁTICA DE SELENIO¹

ALEJANDRO CEBALLOS², FERNANDO GERMAN WITTWER³, PEDRO ALBERTO CONTRERAS⁴,
EDUARDO QUIROZ⁵ y HELGA LIDIA BÖHMWALD⁶

RESUMEN - Con el objeto de validar una técnica para determinar la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) en el Laboratorio de Patología Clínica de la Universidad Austral de Chile y establecer la correlación entre su actividad y la concentración sanguínea y plasmática de selenio (Se) en bovinos a pastoreo en rebaños lecheros del sur de Chile, se tomaron 5-10 mL de sangre heparinizada a 112 vacas de ocho rebaños en la provincia de Valdivia. La actividad enzimática se analizó mediante una técnica cinética, y el Se por activación de neutrones. Fueron calculadas la inexactitud e imprecisión de la técnica cinética y se describen el rango, promedio y desviación estándar de la actividad enzimática. La correlación entre la actividad sanguínea de GSH-Px y la concentración de Se fue obtenida mediante el coeficiente de correlación simple. La inexactitud e imprecisión fueron 5,9% y 10%, respectivamente. La actividad de GSH-Px fue 89 ± 45 U/g de hemoglobina (Hb) y la correlación entre las variables señaladas fue $r=0,97$ ($P<0,05$). Según estos resultados, es posible recomendar el uso rutinario de la técnica descrita. La correlación señalada permite anotar que en bovinos a pastoreo la actividad de GSH-Px está relacionada con la concentración sanguínea de selenio.

Términos para índice: antioxidantes, estrés oxidativo, minerales.

BLOOD ACTIVITY OF GLUTATHIONE PEROXIDASE AND ITS CORRELATION WITH BLOOD SELENIUM CONCENTRATION IN GRAZING DAIRY CATTLE

ABSTRACT - Selenium (Se) is part of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px; EC 1.11.1.9) structure, whose blood activity is related to the blood level of selenium. This study was designed to validate the analytical method to analyze the GSH-Px blood activity at the Clinical Pathology Laboratory of the Universidad Austral de Chile, and to correlate it with blood Se level in dairy cattle from the South of Chile. Blood heparinized samples were taken from 112 dairy cows from eight dairy herds located at Valdivia province, Chile. A kinetic NADPH-dependent technique was used to analyze the blood GSH-Px, and the content of Se in blood and plasma was analyzed by neutron activation. The Se concentration in blood was analyzed in 12 samples to correlate GSH-Px blood activity with blood and plasma Se level. The inaccuracy and imprecision were 5.9% and 10%, respectively. The mean and standard deviation of the obtained values were 89 ± 45 U/g of hemoglobin (Hb). The correlation between blood selenium and blood GSH-Px activity was $r=0.97$ ($P<0.05$). Accordingly, it is possible to analyze the blood activity of GSH-Px by using the described technique. The blood activity of GSH-Px was related to the blood selenium level.

Index terms: antioxidants, oxidative stress, minerals.

¹ Aceptado para publicación en 26 de noviembre.
Proyecto FONDECYT-Chile 195 1062.

² Méd. Vet. Zoot., M.Sc., Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. E-mail: aceballo@uctem.cl

³ Méd. Vet., M.Sc., Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. E-mail: fwittwer@uach.cl

⁴ Méd. Vet., M.Phil., Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. E-mail: pcontre1@uach.cl

⁵ Quím., Instituto de Química, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. E-mail: rquiroz@uach.cl

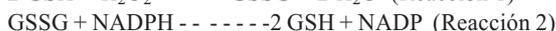
⁶ Tec. Méd., Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

de forraje, fueron enviadas al laboratorio de la Comisión Chilena de Energía Nuclear donde se analizó la concentración de Se.

Método analítico

La actividad sanguínea de GSH-Px se analizó mediante un reactivo comercial basado en una técnica cinética compuesta NADPH-dependiente (Paglia & Valentine, 1967). Los análisis se realizaron en un fotómetro semiautomático Hitachi 4020 con un conjunto múltiple de fotodiodos de diferente longitud de onda.

La técnica está basada en la determinación de la oxidación del glutatión reducido (GSH) por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una reacción catalizada por la GSH-Px que contiene el hemolizado (Reacción 1). El GSH se mantiene a una concentración constante durante la reacción mediante la adición de glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2) y fosfato de nicotinamida adeninucleótido (NADPH); así, el glutatión oxidado (GSSG) se reduce formando GSH y el NADPH es oxidado y consumido durante la reacción (Reacción 2).



La tasa de formación de GSH es monitoreada mediante la disminución en la absorbancia a 340 nm producida por el consumo del NADPH a 37°C. La diferencia en el consumo de NADPH entre el blanco y la muestra determina la actividad enzimática de GSH-Px, siendo ésta directamente proporcional a la disminución en la absorbancia (Langlands et al., 1980). La composición de los reactivos y la concentración final en el ensayo se describen en el Cuadro 1.

En un tubo de reacción se mezclaron 500 µL del Reactivo N° 1 con 10 µL de agua destilada (blanco) ó 10 µL del hemolizado (muestra) y se incubó a 37°C durante 5 minutos; posteriormente, se agregaron 20 µL de la solución con el cumene y se leyó en el fotómetro la disminución en la absorbancia durante 2 minutos a una longitud de onda de 340 nm y una temperatura de 37°C.

La actividad de GSH-Px en U/litro de hemolizado se obtuvo de la ecuación:

$$U/L = (8412 \times \Delta \text{Abs}_{\text{min. muestra}}) - (8412 \times \Delta \text{Abs}_{\text{min. blanco}})$$

Para calcular la actividad de GSH-Px de la muestra en U/g de hemoglobina (Hb) se emplea la ecuación:

$$U/g \text{ Hb} = (U/L \text{ hemolizado} \times 41) / \text{hemoglobina (g/L)}$$

La exactitud de la técnica se controló mediante el análisis de un hemolizado control con una actividad enzimática conocida y cuyo valor promedio era 539 U/L de hemolizado. También se realizó un control externo comparando el valor

obtenido para la actividad enzimática con el valor obtenido en el Laboratorio de la Clínica de Enfermedades del Bovino de la Escuela de Medicina Veterinaria de Hannover, Alemania.

Para el análisis de la precisión se determinó 20 veces la actividad enzimática en un hemolizado preparado en el Laboratorio y obtenido de una muestra de sangre tomada a un animal clínicamente sano.

El Se, tanto en sangre, plasma y forraje, fue determinado mediante activación de neutrones; en esta técnica la muestra es sometida a irradiación marcándose después con un isótopo estable y determinando la cantidad producida del elemento (Gissel-Nielsen et al., 1984).

Análisis de los resultados

Se analizaron la exactitud, inexactitud, precisión e imprecisión de la técnica analítica para la determinación de la actividad sanguínea de GSH-Px (Kohlschein, 1993). Los resultados se describen mediante la obtención del rango de actividad y el cálculo de las estimadas promedio (x) y desviación estándar (DE) (Domènech, 1980). Se obtuvo la frecuencia de grupos de animales con valores bajo 130 U/g Hb, valor que ha sido considerado como el límite bajo el cual habría una deficiencia marginal de Se (Ceballos & Wittwer, 1996). Igualmente, se obtuvo la frecuencia de muestras de forraje con un contenido de Se inferior a 0,1 ppm, valor señalado como la concentración mínima requerida en el forraje para bovinos a pastoreo (McDowell, 1992).

Las correlaciones entre la actividad sanguínea de GSH-Px y la concentración de Se en la sangre, el plasma y el forraje fueron establecidas mediante un coeficiente de correlación simple (Domènech, 1980).

CUADRO 1. Composición de los reactivos y concentración final en el ensayo para la determinación de la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa¹.

Componente	Concentración en el ensayo
Reactivo N° 1:	
Glutatión reducido	4 mmol/L
Glutatión reductasa (EC 1.6.4.2)	> 0,5 U/L
NADPH	0,28 mmol/L
Solución buffer:	
Buffer fosfato (pH 7,2)	0,05 mol/L
EDTA (sal tetrasódica)	4,3 mmol/L
Cumene hidroperóxido	0,18 mmol/L

¹ Adaptado de Randox Laboratories (1994).

boratorio de la Escuela de Medicina Veterinaria de Hannover, Alemania, donde se realizó el control externo. Los resultados de ambos Laboratorios estuvieron dentro del objetivo esperado (Fig. 1). La variación observada en las determinaciones fue baja (5,9%) con respecto a la actividad enzimática promedio en el hemolizado control (539 U/L). Por lo anterior, es posible señalar que el método analítico utilizado es exacto, ya que la exactitud de una técnica está dada cuando se obtienen resultados cercanos a un valor objetivo al analizar un estándar con valores conocidos (Kohlschein, 1993).

El coeficiente de variación obtenido al analizar la actividad enzimática en un hemolizado preparado en el Laboratorio fue un 10%. En otros estudios se han señalado variaciones que fluctúan entre 1,8% y 15% (Wilson & Judson, 1976; Davidson et al., 1990). No obstante, cabe señalar que en el método analítico empleado en los reportes descritos hay variaciones en el pH, temperatura, concentración de la coenzima y concentración del sustrato con respecto a la técnica utilizada en este estudio.

Se ha señalado que una técnica analítica es precisa cuando al analizar repetidamente una misma muestra, la variación entre los valores obtenidos es baja. Por lo general el coeficiente de variación o imprecisión de la técnica no debe ser superior al 10%, excepto para las determinaciones enzimáticas (Me-

rino, 1977); por lo tanto, es posible señalar que la técnica analítica empleada en este estudio es precisa.

Se observaron los 10 grupos de animales con una actividad enzimática promedio inferior a 130 U/g Hb. En otros estudios también se ha encontrado que los animales mantenidos en pastoreo presentan una baja actividad enzimática de GSH-Px en sangre (Backall & Scholz, 1979; Calamari et al., 1989).

En bovinos la correlación entre la actividad de GSH-Px en sangre y la concentración sanguínea de Se es alta, lo que concuerda con los resultados observados en este estudio (Fig. 2). En diferentes estudios se ha encontrado una alta correlación entre la concentración de Se en la sangre y la actividad de GSH-Px; así, se ha observado un $r = 0,93$ ($P < 0,0001$) (Erskine et al., 1987) y un $r = 0,67$ ($P < 0,0001$) (Van Saun et al., 1989). Más recientemente se ha encontrado una correlación entre 0,78 y 0,95 para la asociación entre las variables descritas (Kessler et al., 1992; Jukola, 1994). Se ha señalado en bovinos mantenidos en pastoreo en áreas con diferentes concentraciones de Se una correlación de $r = 0,95$ (Stevens et al., 1985).

La correlación entre la actividad enzimática y la concentración plasmática del mineral fue $r = 0,89$ ($P < 0,05$) (Fig. 3), observándose que el contenido de

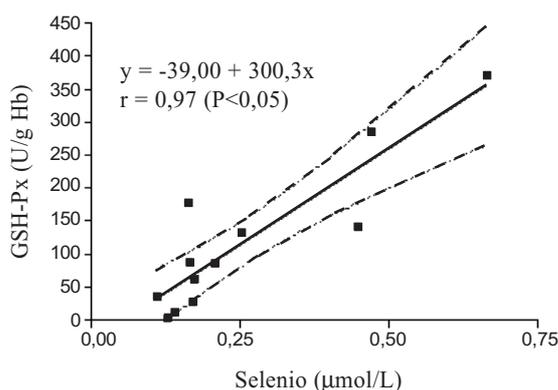


FIG. 3. Regresión y correlación entre la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la concentración plasmática de selenio de 12 bovinos a pastoreo en la X Región de Chile.

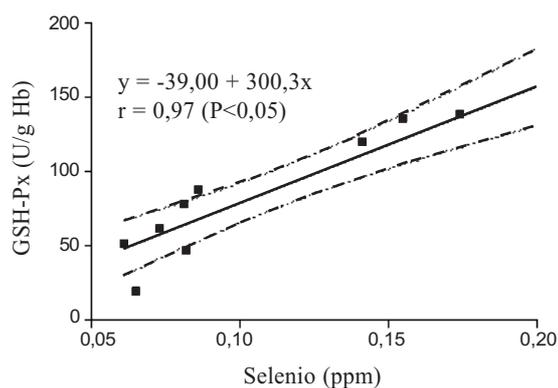


FIG. 4. Regresión y correlación entre la actividad sanguínea promedio de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en 10 grupos de bovinos a pastoreo en la X Región de Chile y el contenido de selenio en el forraje.

ra, lo que demuestra que existe una dependencia de la actividad enzimática del aporte de Se a partir de la ración, y confirma la relación planta-animal para este mineral.

REFERENCIAS

- BACKALL, K.A.; SCHOLZ, R.W. Reference values for a field test to estimate inadequate glutathione peroxidase activity and selenium status in the blood of cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.5, p.733-738, May 1979.
- BURK, R.F.; HILL, K.E. Regulation of selenoproteins. **Annual Review of Nutrition**, v.13, p.65-81, 1993.
- CALAMARI, L.; BERTONI, G.; MAIANTI, M.G.; CAPPA, V. Sull'utilità di nuovi parametri ematochimici nella valutazione del profilo metabolico delle lattifere. **Zootecnica e Nutrizione Animale**, v.15, n.3, p.191-210, giug. 1989.
- CAO, Y-Z.; MADDOX, J.F.; MASTRO, A.M.; SCHOLZ, R.W.; HILDEBRANDT, G.; REDDY, C.C. Selenium deficiency alters the lipoxygenase pathway and mitogenic response in bovine lymphocytes. **Journal of Nutrition**, v.122, p.2121-2127, 1992.
- CEBALLOS, A.; WITTWER, F.G. Metabolismo del selenio en rumiantes. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.28, n.2, p.5-18, 1996.
- CEBALLOS, A.; WITTWER, F.G.; CONTRERAS, P.A.; BÖHMWALD, H. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.30, n.1, p.13-22, 1998.
- DAVIDSON, W.B.; KENNEDY, D.G.; HUGHES, P.J.; BLANCHFLOWER, W.J. The stability of glutathione peroxidase activity in plasma from cattle, pigs and sheep on storage in the presence and absence of glutathione. **Veterinary Research Communications**, v.14, p.441-446, 1990.
- DOMÈNECH, J.M. **Bioestadística: métodos estadísticos para investigadores**. Barcelona: Herder, 1980. 642p.
- ERSKINE, R.J.; EBERHART, R.J.; HUTCHINSON, L.J.; SCHOLZ, R.W. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, n.11, p.1417-1421, 1987.
- FOUCRAS, G.; SCHELCHER, F.; VALARCHER, J.-F.; ESPINASSE, J. La dystrophie musculaire nutritionnelle chez les ruminants. **Le Point Veterinaire**, v.27, n.172, p.33-38, Jan. 1996.
- GISSEL-NIELSEN, G.; GUPTA, U.C.; LAMAND, M.; WESTERMARCK, T. Selenium in soils and its importance in livestock and human nutrition. **Advances in Agronomy**, v.37, p.397-460, 1984.
- HURLEY, W.L.; DOANE, R.M. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.3, p.784-804, Mar. 1989.
- JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1986. 807p.
- 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**. Helsinki: College of Veterinary Medicine-Section of Animal Hygiene, 1994. 195p.
- KESSLER, J.; FRIESECKE, H.; KUNZ, P. Sélénium et vitamine E: approvisionnement de la vache laitière durant la période d'alimentation hivernale. **Revue Suisse D'Agriculture**, v.24, n.2, p.87-91, 1992.
- KOHLSCHEIN, J. **Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium von A bis Z**. Liederbach: Behringwerke AG, 1993. 91p.
- LANGLANDS, J.P.; BOWLES, J.E.; SMITH, A.J.; DONALD, G.E. Selenium concentration in the blood of ruminants grazing northern New South Wales. II. Relationship with geological, pedological and other variables. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.32, p.523-533, 1981.
- LANGLANDS, J.P.; DONALD, G.E.; BOWLES, J.E.; SMITH, A.J. Rapid spot test for glutathione peroxidase activity: Comparison with spectrophotometric procedure and assessment of the test as a measure of selenium in the blood of grazing ruminants. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.31, p.357-367, 1980.
- LOMBA, F. Influence des rapports anions-cations et oxydants-antioxydants dans les rations des vaches laitières en période de tarissement sur l'incidence du syndrome du part. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v.140, p.109-122, 1996.
- MAYLIN, G.A.; RUBIN, D.S.; LEIN, D.H. Selenium and vitamin E in horses. **Cornell Veterinarian**, v.70, p.272-289, 1980.