

# VARIACIONES DE LA FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA EN BOVINOS A PASTOREO SOBRE PRADERAS CON BAJO CONTENIDO DE SELENIO Y SUPLEMENTADOS O NO CON SELENIO

## Variations of the Erythrocyte Osmotic Fragility in Cattle Grazing on Pastures with Low Selenium Content with or without Supplement with Selenium

Ricardo Hugo Chihuailaf Vivanco<sup>1,2</sup>, Fernando Germán Wittwer Menge<sup>1</sup> y Pedro Alberto Contreras Barriga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias. <sup>2</sup>Becario Mecesus, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567. Valdivia, Chile. E-mail: rchihuailaf@uach.cl

### RESUMEN

El selenio es constituyente de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GSH-Px; E.C.1.11.1.9). La deficiencia de selenio en bovinos disminuye la actividad sanguínea de GSH-Px, predisponiendo a las membranas celulares a sufrir un daño oxidativo. La susceptibilidad de los eritrocitos bovinos al estrés oxidativo puede estimarse mediante la prueba de fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE). Con el propósito de evaluar la FOE en bovinos a pastoreo sobre praderas con bajo contenido en selenio, en diferentes periodos del año, se emplearon dos grupos de 16 vaquillas, que pastoreaban praderas con un contenido de selenio inferior a 0,04 ppm. En el mes de marzo, un grupo (Se+) fue suplementado con selenio (Deposel<sup>®</sup>) y el otro grupo (Se-) se mantuvo sin suplementación. Muestras de sangre fueron obtenidas de cada vaquilla previo a la suplementación y luego mensualmente en 10 ocasiones. La FOE se determinó utilizando la técnica descrita por Schalm. La actividad de GSH-Px se midió usando un reactivo comercial (Ransel<sup>®</sup>). La suplementación con selenio incrementó la actividad de GSH-Px a valores considerados adecuados (> 130 U/g Hb). En el grupo Se-, la actividad de GSH-Px fluctuó entre 60-100 U/g Hb. La FOE no registró diferencias entre grupos a la concentración de NaCl 0,55%; sin embargo, ambos grupos mostraron una disminución de la FOE, es decir un aumento en la resistencia de las membranas, desde septiembre, coincidente con el periodo de primavera en el hemisferio sur. Al parecer la pradera en este periodo favorece el aporte de nutrientes antioxidantes relevantes en la protección de las membranas.

**Palabras clave:** Fragilidad osmótica eritrocitaria, estrés oxidativo, selenio, bovinos.

### ABSTRACT

Selenium is a part of antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px; E.C.1.11.1.9). In cattle, the selenium deficiency has been associated with decreased activity of glutathione peroxidase leading to an increase in oxidative damage of cells. The oxidative stress in erythrocytes from cows can be estimated by erythrocyte osmotic fragility test (EOF). To assess EOF as biomarker of oxidative stress in cattle grazing on pastures with low selenium content during different seasons of the year, two groups of sixteen heifers each were used. They were grazed on pastures with 0.04 ppm selenium content. In March one group (Se+) was supplemented with selenium (Deposel<sup>®</sup>) and another (Se-) was maintained unsupplemented. Blood samples were obtained from each heifer prior to supplementation and then one time each month for ten months. The EOF was determined using a technique described by Schalm. The GSH-Px activity was measured using a commercial kit (Ransel<sup>®</sup>). The GSH-Px activity was increased by selenium supplementation to adequate levels (> 130 U/g Hb). The GSH-Px activity in Se- group was 60-100 U/g Hb. No differences between groups were detected in the EOF values, at 0.55% NaCl concentration; however, both groups showed decreased EOF values after September, coincident with the spring season in the southern hemisphere. Seemingly in this period, the more rapidly growing pasture grass increased in levels of some others factors that lead to increased protection against oxidative damage to erythrocytes.

**Key words:** Erythrocyte osmotic fragility, oxidative stress, selenium, cattle.

## INTRODUCCIÓN

La membrana celular constituye una interfase entre el compartimento intra y extracelular que permite el libre recambio de moléculas de agua, estableciéndose un gradiente osmótico. Cuando la célula enfrenta un ambiente hipotónico se genera un movimiento neto de agua libre hacia su interior. Según el grado de hipotonicidad y la capacidad de la membrana para mantener su integridad, la célula se hincha y estalla permitiendo, en el caso de los eritrocitos, la salida de hemoglobina. Esta propiedad es utilizada en la prueba de la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE), que consiste en exponer alícuotas de eritrocitos a concentraciones decrecientes de NaCl, usualmente entre 0,85% y 0%, y luego cuantificar el grado de hemólisis en cada una de ellas [19]. Por lo tanto, la FOE permite evaluar la resistencia y estabilidad de la membrana del eritrocito frente a un estrés osmótico.

El estrés oxidativo ha sido definido como un desequilibrio en favor de la producción de prooxidantes (radicales libres) sobre la capacidad antioxidante celular que puede ocasionar trastornos de distinta magnitud en la fisiología celular [25]. La peroxidación de proteínas y lípidos, causada por la excesiva exposición a prooxidantes, conduce a cambios degenerativos en la hemoglobina y modifica, además, la arquitectura de la membrana celular. Desde el punto de vista funcional, el daño oxidativo de la membrana altera la fluidez, permeabilidad y función metabólica, resultando en un incremento en la fragilidad de la membrana del eritrocito [6, 15]. La FOE ha sido empleada en diferentes especies tales como bovinos, conejos, cerdos, ovinos para estudiar y evaluar el estrés oxidativo [1, 2, 14, 20].

Los eritrocitos de mamíferos son particularmente susceptibles a sufrir daño oxidativo debido a que sus lípidos de membrana son lábiles a la oxidación [8]. Observaciones realizadas en eritrocitos de bovino indican una situación diferente, ya que exhiben una menor susceptibilidad a la acción de radicales libres [2]. Este hecho ha sido atribuido, entre otros factores, a la especial composición y organización de la membrana de eritrocitos de bovino, que se caracteriza por contener pequeñas cantidades de fosfatidilcolina, un fosfolípido altamente peroxidable [7].

Dado a que muchos de los agentes protectores son enzimas que incorporan determinados principios nutritivos o minerales en la estructura de sus moléculas, es posible establecer un vínculo entre el estatus nutricional del individuo y la susceptibilidad a sufrir estrés oxidativo [5]. Al respecto, diversos estudios han corroborado que una ingesta inadecuada de nutrientes deprime la actividad de algunas enzimas antioxidantes, favoreciendo la presentación del estrés oxidativo [9, 22]. La enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px; E.C. 1.11.1.9) es una de las metaloproteínas que interviene en la protección del eritrocito contra la exposición a oxidantes. En presencia de glutatión reducido, GSH-Px cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres. Al igual que otras selenoenzimas, la estruc-

tura de su sitio activo contiene selenio bajo la forma de residuos de selenocisteína [25]. En bovinos y otras especies, se ha determinado que la actividad de GSH-Px se encuentra fuertemente correlacionada con la concentración sanguínea de selenio, ello ha permitido emplearla como un indicador del balance metabólico de este mineral [3, 24]. En consecuencia, una ración con bajo contenido de selenio provoca una disminución de la actividad de GSH-Px, lo que puede afectar la capacidad de respuesta celular frente a la acción de agentes oxidantes y desencadenar la presentación del estrés oxidativo.

Aunque existe controversia en cuanto a los requerimientos de selenio en bovinos lecheros, la National Research Council [16] ha precisado que el contenido de selenio en la dieta debería ser 0,3 ppm base materia seca.

Este trabajo pretende evaluar, en diferentes periodos del año, el comportamiento de la FOE, como indicador del daño oxidativo, en animales a pastoreo sobre praderas con bajo contenido de selenio comparado con animales suplementados con selenio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente ensayo se realizó en un predio lechero, libre de brucelosis, leucosis y tuberculosis, ubicado en la provincia de Valdivia, Chile. De este rebaño, se seleccionaron 32 vaquillas vírgenes, clínicamente sanas, de 18 a 24 meses de edad y con un peso de  $390 \pm 20$  kg. A inicios del período de otoño (marzo), dos meses previo al período de inseminación, fueron distribuidas al azar en dos grupos de 16 animales cada uno: un grupo suplementado (Se+) y un grupo no suplementado (Se-). Cada animal del grupo Se+ fue inyectado con selenato de bario (Deposel<sup>®</sup>, Young's Animal Health, Nueva Zelanda, Ltda) vía s.c. en dosis única de 1 mg de selenio/kg (1 mL/50 kg) de peso vivo. Previo y posterior a la suplementación con selenio, ambos grupos fueron mantenidos a pastoreo en forma conjunta, sobre praderas naturales constituidas principalmente por pasto miel (*Holcus lanatus*), ballica (*Lolium* spp.) y trébol (*Trifolium* spp.) con un bajo contenido de selenio (hasta 0,04 ppm).

De cada animal se extrajo una muestra de 5 mL de sangre con heparina y otra de 10 mL sin aditivo, mediante venopunción coccígea en 11 ocasiones. La primera muestra se obtuvo en el mes de marzo, previo a la suplementación con selenio, y posteriormente se colectaron en forma mensual, hasta el mes de enero. En las muestras de sangre heparinizada se midió la concentración de hemoglobina (Hb). Se tomó una alícuota para la determinación de la FOE y luego se preparó un hemolizado para la medición de la actividad de GSH-Px. De las muestras sin aditivo se obtuvo suero, mediante centrifugación, para la medición de las concentraciones de zinc y cobre.

La concentración de Hb, expresada en g/dL, se determinó mediante el método de la cianometahemoglobina [13]. La actividad de GSH-Px, expresada en U/g de Hb, se analizó se-

gún una técnica cinética compuesta NADPH-dependiente a 340 nm y 37°C en un autoanalizador Cobas Mira Plus de Roche, Suiza, usando un reactivo comercial (Ransel®, Randox Laboratories, Crumlin, Reino Unido) de acuerdo a lo señalado por Ceballos y col. [4]. La FOE fue medida utilizando la técnica descrita por Schalm [19] en un espectrofotómetro Hitachi 4020 a 540 nm. Para ello, se determinó el porcentaje de hemólisis producido al colocar 20 L de sangre en 5 mL de NaCl 0,55%, considerando como 100% la hemólisis producida en el tubo con NaCl 0%. Las determinaciones de zinc y cobre se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 2380, EUA, según las especificaciones del fabricante.

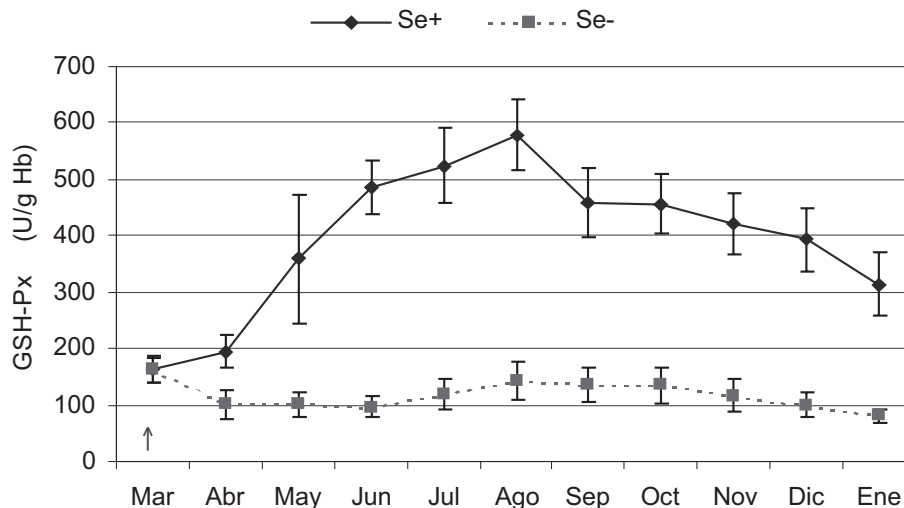
Los resultados se analizaron mediante el uso de estadística descriptiva (media aritmética y desviación estándar). La distribución de los datos fue evaluada mediante la prueba de Skolmogorov-Smirnov [26]. La comparación dentro de grupos se efectuó empleando la prueba de ANDEVA de muestras repetidas [26] y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey [26]. La prueba "t" de Student se utilizó para evaluar diferencias de las medias entre grupos [26]. El nivel de significación empleado fue de  $P < 0,05$ .

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

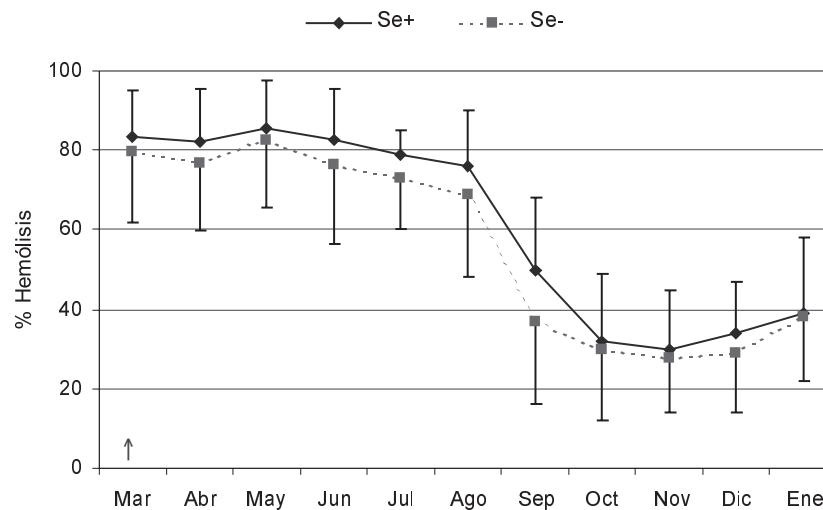
Los valores iniciales promedio de la actividad sanguínea de GSH-Px, indicador empleado para monitorear el estatus de selenio biológicamente activo, en el grupo Se+ y Se- fueron  $160 \pm 22$  U/g de Hb y  $163 \pm 27$  U/g de Hb, respectivamente, sin presentar diferencias significativas. La efectividad de la suplementación con selenio fue evidente con el aumento sostenido en la actividad sanguínea de GSH-Px ( $P < 0,05$ ), con respecto al valor inicial. Este efecto se mantuvo durante el periodo de estudio, alcanzando el máximo a los 150 días post suplementación (FIG. 1). En contraste, los animales del grupo

Se- presentaron una disminución en la actividad de GSH-Px hasta valores considerados marginales (101-130 U/g de Hb) [3] desde el mes de abril. Los valores más bajos observados hacia los meses finales del periodo de primavera estarían relacionados con el consumo de pastos primaverales, caracterizados por contener una baja concentración de selenio [10] y con el avanzado estado de gestación que condiciona mayores requerimientos de nutrientes y minerales [16].

El porcentaje promedio mensual de hemólisis, a la concentración de 0,55% de NaCl, no presentó diferencias ( $P < 0,05$ ) entre los grupos Se+ y Se- durante los periodos de otoño, invierno y primavera. Esto lleva a sostener que los porcentajes de hemólisis no fueron modificados por la suplementación con selenio. Sin embargo, es interesante precisar que los porcentajes promedio de hemólisis variaron desde un estado de mayor fragilidad hacia una condición de mayor resistencia a la lisis osmótica desde el mes de septiembre ( $P < 0,05$ ), correspondiente al inicio de la primavera, hasta el final del periodo experimental, correspondiente al inicio del verano (FIG. 2). Considerando que este incremento en la resistencia osmótica comienza a producirse en primavera, periodo en que la disponibilidad y la calidad del forraje va en aumento y que a su vez, condiciona una disminución en el contenido de selenio [10], puede establecerse que el forraje producido por la pradera favoreció el suministro de principios nutritivos que son relevantes en la mantención de la estabilidad de la membrana celular. Uno de estos principios lo constituye la vitamina E, cuya acción antioxidante influencia fuertemente la estabilidad de la membrana del eritrocito [21]. Vitamina E es un nombre genérico para una serie de compuestos liposolubles denominados tocoferoles y tocotrienoles de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol es el de mayor actividad biológica. La vitamina E se localiza entre las moléculas de fosfolípidos de las membranas deteniendo la propagación de la peroxidación de lípidos mediante la captura e inactivación de los radicales peroxilo [18]. Al respecto, Gut-



**FIGURA 1. PROMEDIO (± D.E.) DE LA ACTIVIDAD SANGUÍNEA DE GSH-Px (U/g Hb) EN VAQUILLAS A PASTOREO SUPLEMENTADAS CON SELENIO (Se+) (↑) Y NO SUPLEMENTADAS (Se-) / MEAN (± S.D.) OF GSH-Px ACTIVITY (U/g Hb) ON GRAZING HEIFERS, SUPPLEMENTED (Se+) (↑) OR NOT SUPPLEMENTED (Se-) WITH SELENIUM.**



**FIGURA 2. PORCENTAJE PROMEDIO ( $\pm$  D.E.) DE HEMÓLISIS A UNA CONCENTRACIÓN DE NaCl 0,55%, EN VAQUILLAS A PASTOREO, SUPLEMENTADAS CON SELENIO (Se+) ( $\uparrow$ ) Y NO SUPLEMENTADAS (Se-) / MEAN ( $\pm$  S.D.) OF HEMOLYSIS PERCENTAGE TO 0,55% NaCl CONCENTRATION, ON GRAZING HEIFERS, SUPPLEMENTED (Se+) ( $\uparrow$ ) OR NOT SUPPLEMENTED (Se-) WITH SELENIUM.**

zwiller [11], se ha planteado que el balance metabólico de la vitamina E es más relevante que GSH-Px en la protección y estabilidad de la membrana celular. La fuente natural de esta vitamina es el forraje verde y su contenido en la pradera es altamente variable dependiendo de factores como la especie forrajera y su estado fenológico. La concentración de vitamina E disminuye rápidamente a medida que la planta madura y también se afecta por las técnicas de conservación de forraje [16]. No obstante, el predominio de la fase progesterónica de las vaquillas en este experimento podría ser otro factor que estaría contribuyendo a disminuir la fragilidad de los eritrocitos al desafío osmótico. En este sentido, estudios realizados por Sarkar y Mondal [17] en yaks (*Poephagus grunniens*) han permitido sostener que la presencia de algunas hormonas esteroideas, particularmente la progesterona, presente en elevadas concentraciones en estos animales gestantes, contribuye a mantener la estabilidad de la membrana de los eritrocitos.

El zinc y el cobre son minerales ligados a la red antioxidante a través de su participación en la estructura de algunas enzimas [25]. La concentración sérica promedio de zinc fluctuó dentro del rango de referencia dado para la especie en ambos grupos [23], sin presentar diferencias significativas. Similar comportamiento se registró en la concentración sérica promedio de cobre. Sin embargo, la tendencia en ambos grupos a presentar valores muy próximos al límite inferior a los valores de referencia a los 180 y 210 días post suplementación, podría estar relacionado con el estado de madurez de la pradera. Al parecer, la concentración de proteínas solubles en la pradera induciría la formación de sulfuros de cobre desde aminoácidos como metionina, cistina y cisteína que son insolubles a nivel ruminal [12]. Pero considerando que ambos grupos tenían concentraciones sanguíneas similares de cobre y zinc, éstos

no serían factores que permitan explicar la mayor resistencia de los eritrocitos en el periodo de primavera.

## CONCLUSIONES

La suplementación con 1mg de selenio/kg usando selenato de bario fue eficaz para mantener la actividad de GSH-Px en valores adecuados durante el periodo de estudio.

La suplementación con selenio no estableció diferencias en la protección de la membrana de los eritrocito evaluado a través de la prueba de FOE.

La estabilidad de la membrana de los eritrocitos está asociada al aporte de otros nutrientes antioxidantes relevantes en la protección de las membranas, diferentes de selenio, presentes en el forraje verde de primavera.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BREZEZIŃSKA-ŚLEBODZIŃSKA, E. Erythrocyte osmotic fragility test as the measure of defence against free radicals in rabbits of different age. *Acta Vet. Hung.* 49: 413-419. 2001.
- [2] BREZEZIŃSKA-ŚLEBODZIŃSKA, E. Species differences in the susceptibility of erythrocytes exposed to free radicals *in vitro*. *Vet. Res. Comm.* 27: 211-217. 2003.
- [3] CEBALLOS, M.A.; WITTEWER, F.G. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 28: 5-12. 1996.
- [4] CEBALLOS, A.; WITTEWER, F.G.; CONTRERAS, P.A.; QUIROZ, E.; BÖHMWALD, H.L. Actividad de glutatión

- peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. **Pesq. Agropec. Bras.** 34: 2331-338. 1999.
- [5] CHOW, C.K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **Am. J. Clin. Nutr.** 32: 1066-1081. 1979.
- [6] EDWARDS, C.J.; FULLER, J. Oxidative stress in erythrocytes. **Comp. Haematol. Int.** 6: 24-31. 1996.
- [7] FLORIN-CHRISTENSEN, J.; SUAREZ, C.E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; WAINSELBAUM, M.; BROWN, W.C.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, G.H. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 98: 7736-741. 2001.
- [8] GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochem. Biophys. Acta** 1271: 321-326. 1995.
- [9] GOFF, J.P.; HORST, R.L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **J. Dairy Sci.** 80: 1260-268. 1997.
- [10] GRANT, A.B.; SHEPPARD, A.D. Selenium in New Zealand pastures. **N. Z. Vet. J.** 31: 131-136. 1983.
- [11] GUTZWILLER, A. Erythrocyte resistance to oxidative damage and leucocyte capacity to reduce nitroblue tetrazolium in selenium deficient cattle. **J. Vet. Med. A** 45: 271-278. 1998.
- [12] IVAN, M.; VEIRA, D.M. Effects of dietary protein on the solubility of manganese, copper, zinc and iron on the rumen and abomasum of sheep. **Can. J. Anim. Sci.** 61: 955-959. 1981.
- [13] JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology.** Lea & Febiger, 1<sup>th</sup> Ed., Philadelphia, USA. 417 pp. 1986.
- [14] KURSA J.; KROUPOVA, V. Osmotic and oxidative haemolysis of erythrocytes in calves with white muscle disease. **Res. Vet. Sci.** 20: 97-98. 1976.
- [15] MORRIS, J.G.; CRIPE, W.S.; CHAPMAN Jr., H.L.; WALKER, D.F.; ARMSTRONG, J.B.; ALEXANDER Jr., J.D.; MIRANDA, R.; SANCHEZ Jr., A.; SANCHEZ, B.; BLAIR-WEST, J.R. Selenium deficiency in cattle associated with Heinz bodies anemia. **Science** 223: 491-493. 1984.
- [16] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Dairy Cattle.** National Academic Press, 7th Ed., Washington D.C., USA. 381 pp. 2001.
- [17] SARKAR, M.; MONDAL, D.B. Osmotic fragility of erythrocytes in periparturient yaks. **Aust. Vet. J.** 77: 821. 1999.
- [18] SCHAFER, F.Q.; WANG, H.P.; KELEY, E.E.; CUENO, K.L.; MARTIN, S.M.; BUETTNER G.R. Comparing -carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. **Biol. Chem.** 383: 671- 681. 2002.
- [19] SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROLL, E.J. **Veterinary Hematology.** Lea & Febiger, 4th Ed., Philadelphia, 807 pp. USA. 1975.
- [20] VELASQUEZ-PEREIRA, J.; MCDOWELL, L.R.; RISCO, C.A.; PRICHARD, D.; MARTIN, F.G.; CALHOUN, M.C.; WILLIAMS, S.N.; WILKINSON, N.S.; OGEBE, P. Effects on performance, tissue integrity, and metabolism of vitamin E supplementation for beef heifers fed a diet that contains gossypol. **J. Anim. Sci.** 76: 2871-884. 1998.
- [21] WANG, X.; QUINN P.J. Vitamin E and its function in membranes. **Progress Lipid Res.** 38: 309-336. 1999.
- [22] WICHTEL, J.J. A review of selenium deficiency in grazing ruminants. Part 1: New roles for selenium in ruminant metabolism. **N. Z. Vet. J.** 46: 47-52. 1998.
- [23] WITTWER, F.; BOHMWALD, H. **Manual de Patología Clínica Veterinaria.** Central de Publicaciones Universidad Austral de Chile, 1ra Ed., Valdivia, Chile. 173 pp.1986.
- [24] WITTWER, F.; ARANEDA, P.; CEBALLOS, A.; CONTRERAS, P.A.; ANDAUR, M.; BÖHMWALD, H.. 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. 2002.
- [25] YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.** 74: 139-162. 1994
- [26] ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis.** PrenticeHall, 4th Ed., Philadelphia, USA. 929 pp. 1998.