

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA EN GLÓBULOS ROJOS Y SU RELACIÓN CON LAS CONCENTRACIONES DE SELENIO SÉRICO EN EQUINOS

Investigadora responsable: Dra. Carolina Durán

Colaboradores: Dr. Ricardo Chihuailaf, Dr. Gabriel Morán, Natalia Rojas

Tesista de pregrado: Catalina Galano

Protocolo de manejo animal Nro. 522/2023

Fundamentación

El selenio es un oligoelemento presente en pequeñas cantidades dentro del organismo, siendo un componente estructural en enzimas como la glutatión peroxidasa, las desyodasas y la tiorredoxina reductasa, jugando un rol importante en la función muscular, la reproducción, la antioxidación y la prevención de tumores. Esta presente tanto en la naturaleza como en los organismos en forma inorgánica (seleniuro, selenato, selenito y selenio) y/o orgánica (selenocisteína y selenomectina) (Mehdi y col, 2013).

Se describen enfermedades asociadas a la carencia de selenio en diversas especies. Para el caso de los bovinos, esta deficiencia favorece cuadros de retención de placenta y metritis perinatal en ganado lechero (Medhi y col, 2016), además de la aparición de la enfermedad del músculo blanco, manifestada por alteraciones en calidad y frecuencia de los latidos cardíacos.

En el caso de los equinos, la deficiencia conlleva a esteatitis, depósitos de grasa amarilla (necrosis grasa) y a la enfermedad del musculo blanco, también llamada miodegeneración nutricional o distrófica (Araya, 2020).

Así, en este estudio se busca determinar si el control de las concentraciones de selenio serico, a través de la administración de suplementación, tanto oral como endovenosa, permite mejorar parámetros clínicos. Los resultados obtenidos a partir de este experimento permitirán obtener evidencia para incorporar o no la suplementación de selenio como terapia adicional en equinos con deficiencia de este mineral, ayudando a su mejoría clínica y eventualmente reduciendo la mortalidad.

Objetivo General

Medir la concentración de selenio a través de GPx en glóbulos rojos.

Objetivos Específicos

- Evidenciar que la medición de GPx en equinos es representativa de la concentración de selenio sérico.
- Demostrar que, a menor vida media celular, mayor es la correlación de la medición de GPx con el selenio.
- Comparar curva de comportamiento del selenio a través de suplementación oral y endovenosa.

Materiales y Métodos

Animales

Equinos (18), adultos sanos, peso aproximado 450Kg, ambos sexos. Los animales a utilizar pertenecen a la Universidad Austral de Chile, y forman parte de grupos de investigación o docencia. Los animales no formarán parte de otros estudios durante el período de muestreo. Todos están alojados en potreros del Hospital Veterinario o del Fundo Teja Norte. Los animales del estudio no se utilizarán para otras actividades durante el período de toma de muestras del estudio.

Todos los animales son mansos y serán manipulados por funcionarios entrenados y médicos veterinarios, utilizando jáquimas y cabestros. Serán transportados a pie hasta las pesebreras y policlínicos del Hospital Veterinario donde se realizarán las tomas de muestras del estudio o las muestras serán tomadas en el mismo fundo sin necesidad de transportarlos hasta las pesebreras.

Diseño experimental

Se reclutarán 18 equinos de uso en docencia e investigación, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinaria UACH, sin enfermedades sistémicas previas ni concurrentes.

La toma de muestras se realizará al día 0, día 15, día 30, día 45, día 60 y día 90 (figura 1), la obtención de sangre se realizará mediante venopunción con aguja 21Gx1" y jeringa de 20 ml en la vena yugular. El contenido total de sangre (20 ml) será dividido para la obtención de glóbulos rojos y plasma, para lo cual será depositada la sangre en tubos con heparina o EDTA, que luego serán analizadas en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Universidad Austral de Chile bajo los siguientes protocolos:

-Eritrocitos: Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente (20°C). 1. Colectar sangre con EDTA (tubos comerciales tapa morada). 2. Centrifugar la muestra a 150 x g durante 10 minutos. 3. Repetir el proceso centrifugando a 200 x g durante 10 minutos 4. El pellet es lavado y resuspendido en PBS.

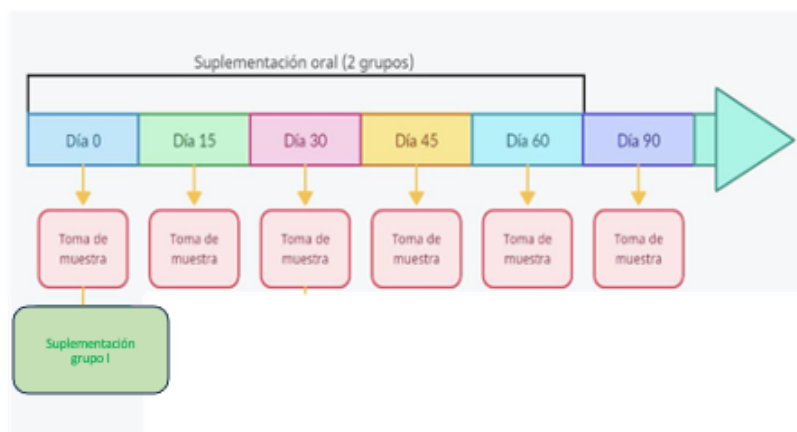
Se procederá a medir la concentración de GPx de cada grupo celular mediante un kit Ransel, Randox® en un fotolorímetro HITACHI 4020, en un lapso de tiempo no superior a 3 meses desde la obtención de la muestra (laboratorio de patología clínica). Paralelamente se medirá la concentración sérica de selenio de cada animal (laboratorio externo) en el mismo tiempo de colecta. Los caballos serán divididos en **3 grupos de 6 animales cada uno**, de acuerdo con la forma en que serán suplementados:

- Grupo I: será suplementado de manera endovenosa con E-SE® a razón de 1ml/ 45 kg por animal, en el día 0 y 30 del experimento.

- Grupo II: será suplementado de manera oral con Vita E plus® en polvo, del laboratorio TRM a razón de 50 g/día/animal, durante los 2 primeros meses del estudio.

- Grupo III: será suplementado de manera oral con Megasel® a razón de 30ml/ 250 kg por animal durante los primeros dos meses del estudio.

Figura 1. Plan temporal general del estudio



Para los objetivos del estudio se planea incluir n=18 animales totales. Consideramos que este pequeño número de animales permitirá realizar un análisis estadístico suficiente para cumplir los objetivos propuestos, teniendo en cuenta que este es la parte preliminar del estudio.

Se llegó al número total de 18 animales, realizando una estimación del mínimo de animales por grupo (n=5) considerando la fórmula de Charan y Kantharia, 2013; una desviación estándar de 35 U/L de GPx en glóbulos de sangre equinos (referencias Laboratorio Patología Clínica Veterinaria, UACH) y diferencia entre medias para lograr una suplementación adecuada de 77 U/ml.

$$\text{Sample size} = 2SD^2 * (19.6 * 0.842^2) / d^2$$

SD standard deviation
d effect size (different between means)

Referencia Laboratorio Patología Clínica
UACH SD GPx → 35 U/ml (GPx 130-600 +/- 35 U/ml)
Mediciones equinos UACH 53 U/ml
Diferencia con la mínima (130-53)=77 U/ml (d)

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3
Compuesto	Selenito de sodio 548 mg/ 100ml y vitamina E 5000 mg/100 ml	VITA-E-PLUS. suplemento alimenticio que combina la actividad antioxidante de la Vitamina E, la Vitamina C y el Selenio, junto con el amino-ácido esencial Lisina y Vitamina B.	MEGA-SEL suplemento de vitamina E y selenio para caballos
Presentación farmacéutica:	Frasco de 100 ml	Caja de 5 kg	Botella de 3.78 lt
Dosis	1 ml/45 kg	50 g/animal	30 ml/250kg
Vía (indicar calibre de aguja, sonda, etc...)	Endovenosa, aguja 21 G	Oral (administrado con una pequeña cantidad de cubos de alfalfa remojados)	Oral (administrado con una pequeña cantidad de cubos de alfalfa remojados)
Volumen	Aprox 10 ml	50 gramos	Aprox 50 ml
Frecuencia de administración	Cada 60 días	1 vez al día	1 vez al día
Duración tratamiento	2 meses	2 meses	2 meses
Responsable administración del compuesto	Catalina Galano y Carolina Durán Graeff	Catalina Galano	Catalina Galano

Respecto a la administración de selenio por vía intravenosa, si bien no es la indicada por el fabricante, esta se ha preferida durante años en la práctica clínica nacional e internacional debido al alto riesgo de desarrollo de abscesos musculares y miositis posterior a la inyección intramuscular. En la segunda fase del estudio, se compararán 2 métodos orales de suplementación en relación al

“gold standard” usado en la práctica clínica nacional e internacional, que es la inyección intravenosa. Por su parte la inyección intravenosa en casos muy aislados ha causado la muerte súbita de animales supuestamente sanos (comunicación personal con colegas del área). Sin embargo, en la experiencia de dos especialistas que tienen una vasta experiencia en el tratamiento y suplementación de equinos con selenio, esta reacción ha sido asociada a la administración rápida del fármaco en animales enfermos o con sintomatología subclínica.

La administración de selenio al realizarse de forma correcta no tiene efectos detrimentales sobre la salud de los equinos*, más bien logra mejorar el estado de salud, mejorando la funcionalidad metabólica, inmunológica y reproductiva de los animales.

Por lo anterior, los criterios para retiro de los animales del estudio serían sólo la venta, transporte, enfermedad o muerte de los animales por causas no asociadas al estudio.

*<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=74620a2d-a633-4af7-9a29-9da71623e450&type=display#:~:text=Not%20to%20be%20used%20in,at%205%2D10%20day%20intervals.> (indicaciones del National Institute of Health)

Análisis de datos

Se usará un software estadístico (IBM SPSS Statistics 29.0.10) para el análisis de datos. Una vez analizada la distribución de datos, se usará ANOVA para detectar diferencias entre tratamientos. La prueba de Chi-cuadrado de Pearson será usada para determinar la eficiencia terapéutica de cada tratamiento (alcanzar concentraciones séricas de GPx sobre 120 U/g Hb).

RESULTADOS

Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 1.

Antes de iniciar el estudio (tiempo 0, T0), las concentraciones promedio de GPx medidas fueron 34,7; 43,0 y 60,8U/g Hb para el grupo I, II y III, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre grupos.

La administración de selenio, aumentó las concentraciones de GPx sérico en todos los grupos desde el T15 al T60. Sin embargo, sólo en los grupos II y III se lograron alcanzar concentraciones mínimas promedio de GPx sérico en los tiempos 45 y 60. Mientras que la administración inyectable sólo alcanzó concentraciones promedio de 113,5 U/g Hb al tiempo 60 (bajo las concentraciones mínimas normales). Por otra parte, la administración oral de selenio (grupo II y III) mostró ser superior a la administración inyectable de selenio alcanzando concentraciones promedio de 162,8 y 181, 7 U/g Hb en los grupos II y III, respectivamente.

Al comparar los resultados de los grupos de administración oral, si bien las concentraciones promedio de GPx del grupo III fueron superiores a las del grupo II, no se detectaron diferencias significativas debido a la desviación estándar de los resultados en ambos grupos.

Tabla 1. Concentración de enzima glutatión peroxidasa (GPx) en glóbulos rojos equinos antes (T0) y 15, 30, 45 y 60 días (T15, T30, T45, T60) después de suplementación con selenio inyectable (Grupo I) u oral (Grupo II y III).

GPx en glóbulos rojos (U/g Hb)										
	T0		T15		T30		T45		T60	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
I	34,7	4,9	58,3	7,2	51,3	6,1	111,2	14,8	113,5	17,1
II	43,0	16,6	58,5	31,5	59,5	30,1	124,2	36,6	162,8	47,6
III	60,8	51,3	104,7	71,6	88,8	43,6	174,2	35,4	181,7	33,3

Gráfico 1: concentraciones medias de enzima glutatión peroxidasa (GPx) y desviación estándar el día 0, 15, 45, 30 y 60 de suplementación, para los grupos I (selenio inyectable), II y III (selenio oral).

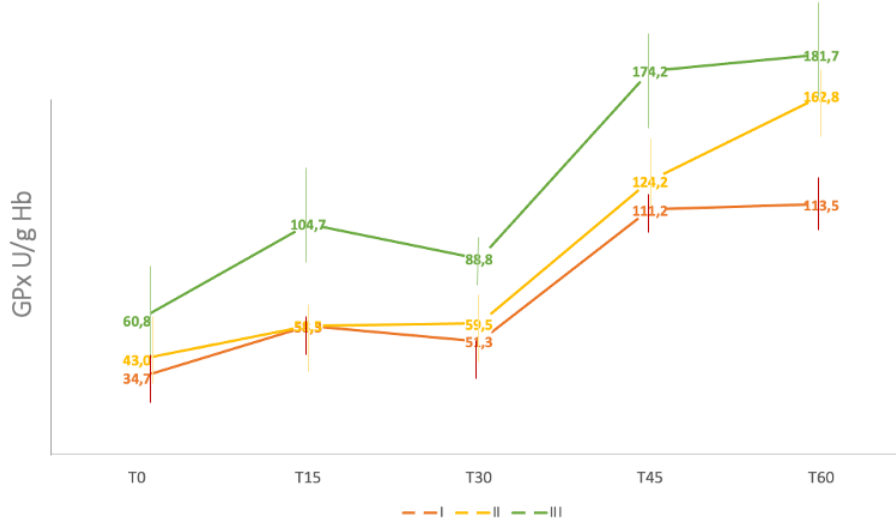


Gráfico 2: concentraciones medias de enzima glutatión peroxidasa (GPx) y desviación estándar al día 60 de suplementación, para los grupos I (selenio inyectable), II y III (selenio oral).

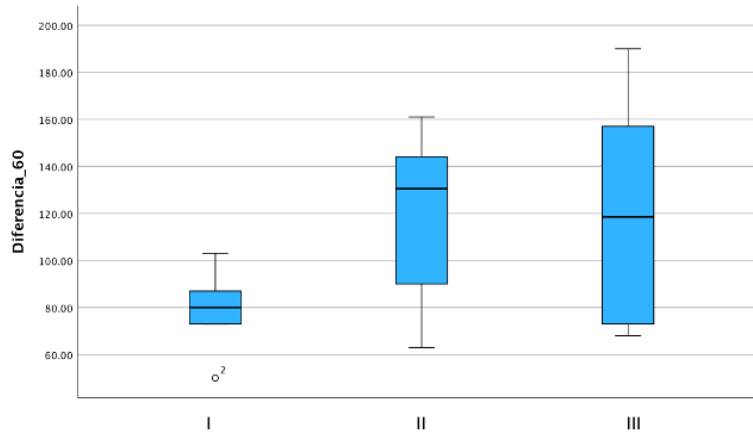
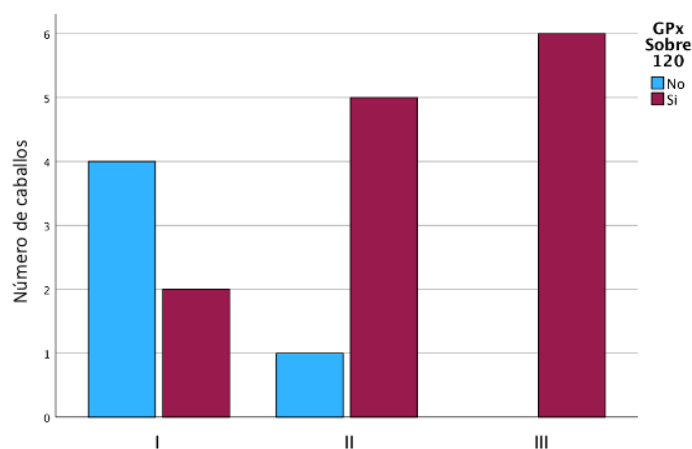


Gráfico 3: número de caballos por grupo con concentraciones medias de enzima glutatión peroxidasa (GPx) por sobre 120 U/g Hb al finalizar el estudio (día 60, T60).



ANEXOS
Descriptivos

Diferencia_60

	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media		Mínimo
					Límite inferior	Límite superior	
Inyectable	6	78.8333	17.71346	7.23149	60.2442	97.4225	50.00
Vita E Plus	6	119.8333	36.71194	14.98759	81.3065	158.3602	63.00
Megasel	6	120.8333	49.20738	20.08883	69.1934	172.4733	68.00
Total	18	106.5000	40.07823	9.44653	86.5696	126.4304	50.00

Descriptivos

Diferencia_60

	Máximo
Inyectable	103.00
Vita E	161.00
Plus	
Megasel	190.00
Total	190.00

Pruebas de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Diferencia_60	Se basa en la media	4.548	2	15	.029
	Se basa en la mediana	3.580	2	15	.054
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	3.580	2	11.819	.061
	Se basa en la media recortada	4.422	2	15	.031

ANOVA

Diferencia_60

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6892.000	2	3446.000	2.532	.113
Dentro de grupos	20414.500	15	1360.967		
Total	27306.500	17			

Pruebas robustas de igualdad de medias

Diferencia_60

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	4.033	2	8.455	.059

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc



Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Diferencia_60

HSD Tukey

(I) TRATAMIENT O_	(J) TRATAMIENT O_	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Inyectable	Vita E Plus	-41.00000	21.29919	.166	-96.3240	14.3240
	Megasel	-42.00000	21.29919	.153	-97.3240	13.3240
Vita E Plus	Inyectable	41.00000	21.29919	.166	-14.3240	96.3240
	Megasel	-1.00000	21.29919	.999	-56.3240	54.3240
Megasel	Inyectable	42.00000	21.29919	.153	-13.3240	97.3240
	Vita E Plus	1.00000	21.29919	.999	-54.3240	56.3240

Subconjuntos homogéneos

Diferencia_60

HSD Tukey^a

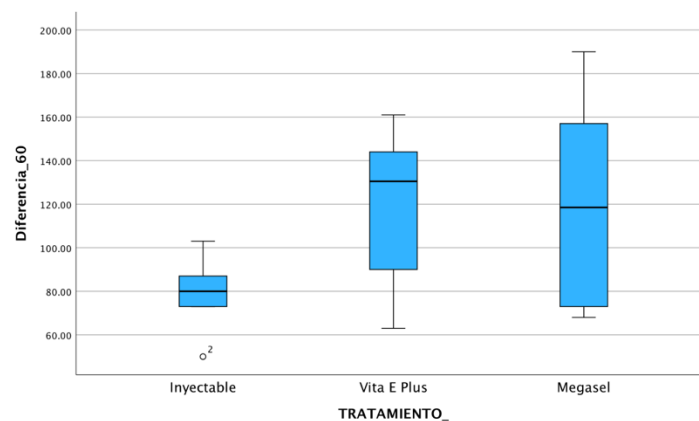
TRATAMIENT O_	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Inyectable	6	78.8333
Vita E Plus	6	119.8333
Megasel	6	120.8333
Sig.		.153

Se visualizan las medias para los grupos

en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

Diferencia_60



Descriptivos

	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media		
					Límite inferior	Límite superior	
Diferencia_15	Inyectable	6	23.6667	5.85377	2.38979	17.5235	29.8098
	Vita E Plus	6	15.5000	17.52427	7.15425	-2.8906	33.8906
	Megasel	6	43.8333	21.83957	8.91597	20.9141	66.7526
	Total	18	27.6667	19.76926	4.65966	17.8356	37.4977
Diferencia_30	Inyectable	6	-7.0000	6.35610	2.59487	-13.6703	-3.297
	Vita E Plus	6	1.0000	3.52136	1.43759	-2.6954	4.6954
	Megasel	6	-15.8333	30.90901	12.61855	-48.2703	16.6037
	Total	18	-7.2778	18.61627	4.38790	-16.5354	1.9799
Diferencia_45	Inyectable	6	59.8333	14.79752	6.04106	44.3043	75.3624
	Vita E Plus	6	64.6667	8.47742	3.46089	55.7702	73.5632
	Megasel	6	85.3333	31.23886	12.75321	52.5502	118.1165
	Total	18	69.9444	22.40660	5.28129	58.8019	81.0870
Diferencia_45_60	Inyectable	6	2.3333	19.98666	8.15952	-18.6414	23.3080
	Vita E Plus	6	38.6667	26.88246	10.97472	10.4553	66.8781
	Megasel	6	7.5000	33.24304	13.57142	-27.3864	42.3864
	Total	18	16.1667	30.45971	7.17942	1.0194	31.3139

Descriptivos

		Mínimo	Máximo
Diferencia_15	Inyectable	16.00	33.00
	Vita E Plus	3.00	50.00
	Megasel	23.00	77.00
	Total	3.00	77.00
Diferencia_30	Inyectable	-17.00	2.00
	Vita E Plus	-2.00	7.00
	Megasel	-66.00	17.00
	Total	-66.00	17.00
Diferencia_45	Inyectable	44.00	78.00
	Vita E Plus	53.00	78.00
	Megasel	49.00	130.00
	Total	44.00	130.00
Diferencia_45_60	Inyectable	-33.00	24.00
	Vita E Plus	7.00	71.00
	Megasel	-40.00	56.00
	Total	-40.00	71.00

Pruebas de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Diferencia_15	Se basa en la media	2.901	2	15	.086
	Se basa en la mediana	2.191	2	15	.146
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2.191	2	10.220	.161
	Se basa en la media recortada	2.714	2	15	.099
Diferencia_30	Se basa en la media	11.370	2	15	<.001
	Se basa en la mediana	2.872	2	15	.088
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2.872	2	5.323	.143
	Se basa en la media recortada	10.165	2	15	.002
Diferencia_45	Se basa en la media	5.417	2	15	.017
	Se basa en la mediana	3.315	2	15	.064
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	3.315	2	7.239	.095
	Se basa en la media recortada	5.163	2	15	.020
Diferencia_45_60	Se basa en la media	.897	2	15	.429
	Se basa en la mediana	.575	2	15	.575
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	.575	2	11.365	.578
	Se basa en la media recortada	.892	2	15	.430

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Diferencia_15	Entre grupos	2552.333	2	1276.167	4.678	.026
	Dentro de grupos	4091.667	15	272.778		
	Total	6644.000	17			
Diferencia_30	Entre grupos	850.778	2	425.389	1.266	.310
	Dentro de grupos	5040.833	15	336.056		
	Total	5891.611	17			
Diferencia_45	Entre grupos	2201.444	2	1100.722	2.607	.107
	Dentro de grupos	6333.500	15	422.233		
	Total	8534.944	17			
Diferencia_45_60	Entre grupos	4636.333	2	2318.167	3.122	.073
	Dentro de grupos	11136.167	15	742.411		
	Total	15772.500	17			

Pruebas robustas de igualdad de medias

		Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Diferencia_15	Welch	2.935	2	7.722	.113
Diferencia_30	Welch	4.006	2	8.189	.061
Diferencia_45	Welch	1.514	2	8.512	.274
Diferencia_45_60	Welch	3.424	2	9.579	.076

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

HSD Tukey

Variable dependiente	(I) TRATAMIENTO_	(J) TRATAMIENTO_	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
Diferencia_15	Inyectable	Vita E Plus	8.16667	9.53551	.675	-16.6015
		Megasel	-20.16667	9.53551	.120	-44.9349
	Vita E Plus	Inyectable	-8.16667	9.53551	.675	-32.9349
		Megasel	-28.33333*	9.53551	.024	-53.1015
	Megasel	Inyectable	20.16667	9.53551	.120	-4.6015
		Vita E Plus	28.33333*	9.53551	.024	3.5651
Diferencia_30	Inyectable	Vita E Plus	-8.00000	10.58388	.735	-35.4913
		Megasel	8.83333	10.58388	.688	-18.6580
	Vita E Plus	Inyectable	8.00000	10.58388	.735	-19.4913
		Megasel	16.83333	10.58388	.280	-10.6580
	Megasel	Inyectable	-8.83333	10.58388	.688	-36.3246
		Vita E Plus	-16.83333	10.58388	.280	-44.3246
Diferencia_45	Inyectable	Vita E Plus	-4.83333	11.86358	.913	-35.6486
		Megasel	-25.50000	11.86358	.113	-56.3153
	Vita E Plus	Inyectable	4.83333	11.86358	.913	-25.9820
		Megasel	-20.66667	11.86358	.223	-51.4820
	Megasel	Inyectable	25.50000	11.86358	.113	-5.3153
		Vita E Plus	20.66667	11.86358	.223	-10.1486
Diferencia_45_60	Inyectable	Vita E Plus	-36.33333	15.73119	.085	-77.1946
		Megasel	-5.16667	15.73119	.942	-46.0280
	Vita E Plus	Inyectable	36.33333	15.73119	.085	-4.5280
		Megasel	31.16667	15.73119	.151	-9.6946
	Megasel	Inyectable	5.16667	15.73119	.942	-35.6946
		Vita E Plus	-31.16667	15.73119	.151	-72.0280

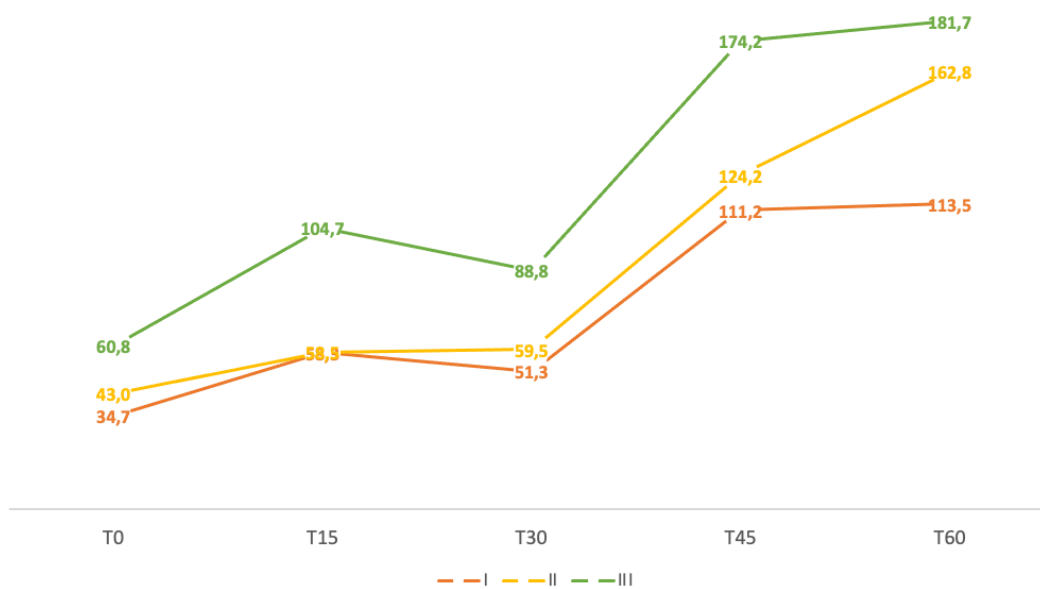
Comparaciones múltiples

HSD Tukey

Variable dependiente	(I) TRATAMIENTO_	(J) TRATAMIENTO_	Intervalo de confianza al 95% Límite superior
Diferencia_15	Inyectable	Vita E Plus	32.9349
		Megasel	4.6015
	Vita E Plus	Inyectable	16.6015
		Megasel	-3.5651
	Megasel	Inyectable	44.9349
		Vita E Plus	53.1015
Diferencia_30	Inyectable	Vita E Plus	19.4913
		Megasel	36.3246
	Vita E Plus	Inyectable	35.4913
		Megasel	44.3246
	Megasel	Inyectable	18.6580
		Vita E Plus	10.6580
Diferencia_45	Inyectable	Vita E Plus	25.9820
		Megasel	5.3153
	Vita E Plus	Inyectable	35.6486
		Megasel	10.1486
	Megasel	Inyectable	56.3153
		Vita E Plus	51.4820
Diferencia_45_60	Inyectable	Vita E Plus	4.5280
		Megasel	35.6946
	Vita E Plus	Inyectable	77.1946
		Megasel	72.0280
	Megasel	Inyectable	46.0280
		Vita E Plus	9.6946

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

GPX U/G HB - RBCS



Resumen de procesamiento de casos

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
TRATAMIENTO_*	18	100.0%	0	0.0%	18	100.0%
Sobre_120						

Tabla cruzada TRATAMIENTO_*Sobre_120

			Sobre_120		Total
			No	Si	
TRATAMIENT O_	Inyectable	Recuento	4	2	6
		% dentro de Sobre_120	80.0%	15.4%	33.3%
	Vita E Plus	Recuento	1	5	6
% dentro de Sobre_120		20.0%	38.5%	33.3%	
Megasel	Recuento	0	6	6	
	% dentro de Sobre_120	0.0%	46.2%	33.3%	
Total	Recuento	5	13	18	
	% dentro de Sobre_120	100.0%	100.0%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl.	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7.200 ^a	2	.027
Razón de verosimilitud	8.225	2	.016
Asociación lineal por lineal	6.277	1	.012
N de casos válidos	18		

a. 6 casillas (100.0%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento mínimo esperado es 1.67.

Medidas simétricas

	Valor	Significación aproximada
Nominal por Nominal	Phi V de Cramer	.632 .632
N de casos válidos	18	

