3. Determinación de selenio: importancia y medición

M. L. Gil del Castillo, J. A. Noguera Velasco, P. Martínez Hernández

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia

3.1. ¿Qué es el selenio?

El selenio fue descubierto en 1817 cuando un científico sueco encontró un residuo rojo en el material de desecho que se forma durante la producción de ácido sulfúrico en una mina de sulfuro de cobre de Falun (Suecia). Debido a que sus propiedades químicas eran similares al telurio, se describió como tal, hasta que poco después J. J. Berzelius descubrió que se trataba de un nuevo elemento con propiedades únicas.

Es un mineral traza, esencial para la salud (1, 2). Forma parte de la selenoproteínas, con propiedades antioxidantes, lo cual ayuda a prevenir el daño celular frente a los radiacales libres. Éstos son productos derivados del metabolismo que contribuyen al desarrollo de patologías como el cáncer o la enfermedad coronaria (2, 3). Por otra parte, colaboran en la regulación de la función tiroidea y representan un papel importante en el sistema inmune (4). Entre 1979 y 1981 dos equipos de investigadores independientes demostraron la reversibilidad de los síntomas clínicos en dos síndromes presumiblemente atribuidos a carencia de selenio: la enfermedad de Keshan (5) y la distrofia muscular aparecida tras períodos prolongados de nutrición parenteral (6).

En el siguiente cuadro se indican aquellas selenoproteínas con una acción fisiológica relevante y conocida (7):

SELENOPROTEÍNAS	FUNCIONES
Glutation-peroxidasas GPx1,2,4	Enzimas antioxidantes: Eliminan el peróxido de hidrógeno, modulan la síntesis de eicosanoides modificando la inflamación y disminuyen el daño oxidativo de lípidos, lipoproteínas y DNA
Selenoproteína de la cápsula mitocondrial del esperma	Forma de la GPx4: protege el desarrollo de las células espermáicas de daño oxidativo, así como su madurez y estabilidad.
Iodotironina-desiodinasa (tres isoformas)	Producción y regulación del nivel de T3 a partir de T4
Tioredoxina-reductasa (tres isoformas)	Reducción de los nucleótidos en la síntesis del DNA, control del estado redox intracelulcar; reguladoras de la expresión genética por control redox de la unión de factores de transcripción al DNA

SELENOPROTEÍNAS	FUNCIONES
Iselenofosfato-sintetasa SPS2	Necesaria para la síntesis del selenofosfato precursor de la selenocisteína y, por tanto, de la síntesis de las selenoproteínas
Selenoproteína P	Proteína plasmática que parece tener un efecto protector de las células endoteliales frente al ataque de peroxinitritos
Selenoproteína W	Necesaria para función muscular
Selenoproteína del epitelio prostático, 15kDa	Localizada en las células epiteliales de la próstata ventral. Parece tener una función redox similar a la GPx4. Quizá posee acción protectora de las células secretoras frente al carcinoma
Selenoproteína unida al DNA de las espermatides, 34kDa	Actividad similar a la glutation-peroxidasa. Producida en el estómago y núcleo de los espermatozoides. Puede proteger el desarrollo del esperma.
Selenoproteína de 18kDa	Producida en riñón y otros órganos. Conservada incluso en los estados de deficiencia en selenio

3.2. Selenio y cáncer

Su relación con la prevención del cáncer está muy bien documentada. Diversos estudios epidemiológicos han establecido que existe una relación clara y directa entre un bajo nivel de selenio en sangre y cáncer.

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar el efecto antitumorigénico del selenio, inclucluyendo efectos antioxidantes, aumento de la función inmune, inducción de apoptosis, inhibición de la proliferación celular, alteración del metabolismo carcinogénico y metabolitos citotóxicos. Existe una creciente evidencia que señala que el selenio inhibe importantes pasos precoces del crecimiento y de los inhibidores del ciclo celular, incluyendo las ciclinas A y D1, p16 y p27.

Otros autores mostraron una importante reducción en la regulación de la selenoproteína-P durante la evolución carcinogénica de la neoplasia prostática epitelial de bajo grado (8). Brooks y cols. (9) observaron que el descenso del nivel de selenio en suero se asocia a cuatro a cinco veces el riesgo de cáncer de próstata.

También se ha asociado la disminución en el nivel de selenio sérico con el riesgo posterior de muerte por carcinoma de células escamosas, cáncer del cardias y/o estómago, patología cardiaca y ACV (10, 11).

Estudios hechos en enfermos con cáncer de cabeza y cuello inmunocomprometidos han evidenciado menores concentraciones de selenio plasmático que en sujetos sanos (12), así como en pacientes con carcinoma de laringe (13).

Se ha encontrado una asociación entre el estrés oxidativo y el descenso de concentración en pacientes con cáncer de mama (14), igualmente en chicos con leucemia aguda (15).

Lo que no está claro es si el descenso de niveles de selenio es responsable de la enfermedad o un efecto secundario. Estudios prospectivos investigan la relación entre el efecto quimiopreventivo del selenio frente a la inhibición del crecimiento celular y la inducción de la apoptosis in vitro (16).

También se ha contemplado la posibilidad de que estos bajos niveles se deban a la malnutrición de estos pacientes (17). Por otro lado, hay estudios que demuestran que existen alimentos ricos en selenio que por la presencia de otras sustancias antagonistas no son una buena fuente de selenio (18).

3.3. Selenio y enfermedad cardiaca

Diversos estudios han enfatizado una posible relación entre un insuficiente consumo de selenio y el infarto del miocardio y, aunque no existe una definición final, está demostrado que la ausencia de selenio en el organismo causa trastornos de consideración en las funciones hepática y muscular, con consecuencias nefastas para el corazón.

Se ha puesto de manifiesto la asociación entre un bajo nivel antioxidante y una mayor incidencia de enfermedades cardiacas (19). El estrés oxidativo provocado por los radicales libres producidos durante el metabolismo puede provocar alteraciones cardiacas. Por ejemplo, el poder oxidativo de las LDL induce la formación de placas de ateroma en las arterias; el selenio es uno de los antioxidantes que puede ayudar a poner límites a la acción de las LDL. Sin embargo es insuficiente recomendar un suplemeto dietético con selenio para prevenir el riesgo coronario.

3.4. Selenio y artritis

Individuos con artritis reumatoide, tienen reducidos los niveles séricos de selenio (20). El sistema inmune puede crear radicales libres que dañen los tejidos, pero el selenio como antioxidante alivia los síntomas de la artritis mediante el control de los radicales libres (21).

3.5. Selenio y HIV

La malabsorción puede interferir la incorporación de muchos nutrientes, incluido el selenio. La deficiencia de éste se asocia a la disminución del número de células inmunes y al aumento del riesgo de muerte en caso de HIV (22). El virus destruye el sistema inmune y los radicales libres contribuyen al daño, de una parte el selenio actúa como antioxidante. Puede ser que el virus necesite del selenio para su replicación, lo cual podría explicar los bajos niveles del metal en estos pacientes (23).

3.6. Selenio y tiroides

La deficiencia de selenio puede afectar la función tiroidea, de modo que la hormona tiroidea activa es sintetizada en presencia de la enzima tioredoxin reductasa, de la que el selenio es un constituyente esencial. Un adecuado nivel de selenio protege de los efectos neuronales que provoca una deficiencia en la hormona tiroidea (24).

3.7. Selenio y otras patologías

Patologías como la pancreatitis crónica o la cirrosis, en enfermedad celiaca, se ven agravadas por la deficiencia en selenio, siendo aconsejable la suplementación dietética (25).

3.8. Selenio y los niños

En general, la población pediátrica es considerada más susceptible a los riesgos por deficiencia de selenio, entre ellos los recién nacidos pretérmino alimentados con leches de fórmula sin suplemento de selenio, y los que están sometidos a estrés oxidativo durante mucho tiempo (26).

3.9. Necesidades de selenio

En adultos, las necesidades de selenio no se han establecido pero se plantea que son aconsejables entre 55 y 70 microgramos al día. De forma ideal el organismo humano contiene de 10 a 30 microgramos, distribuidos, principalmente, en glándulas, hígado y riñones. Propuestas basadas en los aspectos preventivos extienden las necesidades de selenio entre 250 y 300 microgramos al día, cifra que no resulta alarmante (27), toda vez que en pueblos asiáticos, apegados por tradición al consumo de pescado, llegan a tomar hasta 500 microgramos sin ninguna reacción adversa.

3.10. Intoxicación por selenio

Si bien la carencia de selenio resulta perjudicial para la salud, su exceso puede resultar tóxico, manifestado en un tono amarillento de la piel, pérdida de las uñas y fatiga, vómitos, diarrea, acidosis metabólica, espasmos musculares, daños en mucosas, aliento a ajo; pero esto ocurre en casos excepcionales y probables sólo cuando supera la dosis de 500 microgramos, sus efectos pueden expresarse con la aparición de la enfermedad denominada selenosis, la que se identifica, entre otros síntomas, por la pérdida del cabello y uñas, aliento a ajo, lesiones dermatológicas, trastorno gastrointestinal (28). Por lo general, los excedentes retrasan la aparición y crecimiento de células tumorales y no suprimen las funciones naturales del sistema inmunológico.

Las mejores fuentes de selenio se encuentran en las carnes rojas, las vísceras y los productos de origen animal. También se localiza en algunos granos, cereales, frutas y verduras, pero en cantidades variables en dependencia de la composición de los suelos. Tanto el pescado de río como el de mar aportan elevado contenido de selenio y la mejor absorción, entre los alimentos de origen vegetal, corresponde a la soja y los cereales (29).

Por regla general, la deficiencia de selenio en niños tarda en desarrollarse y los principales síntomas que manifiestan están casi siempre asociados a otras afecciones, ya que por lo general se expresa a través de debilidad, dolor e hipersensibilidad muscular.

3.11. Determinación de selenio en muestras biológicas

Hace ya 50 años que se determina el selenio en muestras biológicas humanas mediante técnicas como *titration iodometrica* (30), que requerían grandes volúmenes de muestra. El desarrollo de técnicas colorimétricas y métodos fluorométricos han hecho que el análisis biológico sea más cómodo de realizar. Durante los años ochenta, la espectrometría de fluorescencia molecular ha sido sustituida por la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros y la espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito. De hecho, el mayor cambio para la rutina del análisis ha sido el uso de esta última tecnología.

Esta técnica ofrece un análisis directo sin necesidad de realizar digestión de la muestra. Hay que tener en cuenta dos cuestiones:

- La sensibilidad no es muy elevada, no es prudente hacer grandes diluciones de la muestra.

- La corrección de fondo a longitudes de onda por debajo de 196 nm causa problemas. La presencia de hierro o fosfato en la muestra provoca un problema conocido como *overcorrection.* Si el sistema dispone de corrección Zeeman se evita esta interferencia (31).

Es importante añadir un modificador de matriz que estabilice el selenio a una temperatura lo más alta posible en la etapa de pirólisis, de forma que se elimine la mayor parte de la matriz sin que se pierda el selenio. En la actualidad se utiliza el paladio, que ofrecen alta sensibilidad, pocas interferencias y permite mezclar el plasma sin precipitar las proteínas (32).

La determinación del selenio en plasma puede presentar interferencias debidas al uso del modificador, que se subsana utilizando una combinación de matriz con estándar y calibrando.

El selenio puede ser determinado en tejido previa digestión del mismo con nítrico o bien de forma directa, en cámara de grafito. Lindberg *et al.* (33) usan una copa en el interior del tubo atomizador donde se sitúa el polvo seco del tejido. La adición de paladio estabiliza el selenio de la muestra mejor que la adición de níquel. La calibración se realiza con material estándar a base de hígado bovino.

3.12. Procedimiento de medida

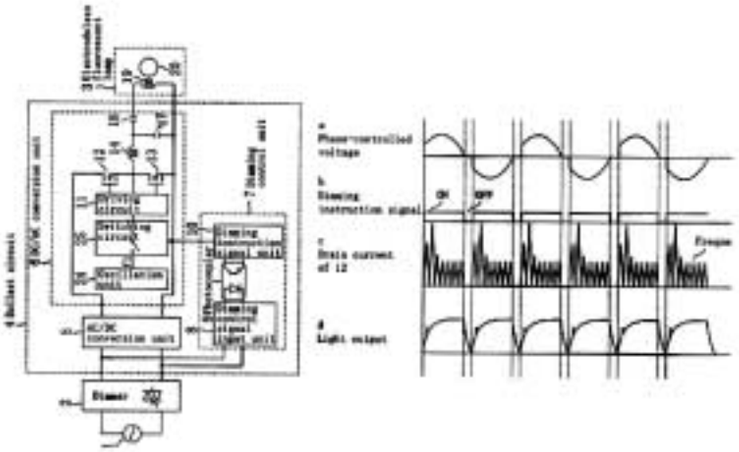
El procedimiento descrito es lineal hasta 5,06 umol/l.

El límite de detección es de 1,01 umol/l; la masa característica de 39,1 pg/0,0044 unidades de absorbancia, la recuperación media de 102,3% y la precisión media de 4,5%.

3.12.1. Condiciones de análisis

Se utiliza un espectométro de absorción atómica electrotérmica con corrector de fondo Zeeman (34).

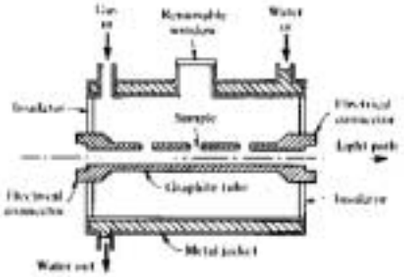
La lámpara es de descarga sin electrodos, con precalentamiento de 30 minutos. La longitud de onda empleada es 196.0 nm, la intensidad de corriente 290 mA y la rendija de 0.7 nm.



Lámpara de descarga sin electrodos

Se utiliza cámara de grafito con plataforma integrada, se realiza la lectura en érea de pico, utilizando un tiempo de integración de cuatro segundos y un volumen de muestra de 20 ul.

Cámara de grafito



El programa de temperatura del horno de grafito (35):

	Temp. C	Rampa s	Tiempo s	Flujo ml/min	Gas	Lectura
1	110	1	20	250	Argón	No
2	130	1	30	250	Argón	No
3	1.250	5	30	250	Argón	No
4	2.000	0	4	0	Argón	Sí
5	2.450	1	3	250	Argón	No

3.12.2. Modificador de matriz

Los componentes son:

Paladio (10g/l de Pd[NO3]2 en HNO3 al 15%) .....1 ml

Tritón X-100 ..... 0,1 ml

agua suprapura de 18 MΩ/cm de resistividad ..... c. s. p. 100 ml

3.12.3. Preparación de la muestra

El suero o plasma se centrifugará diez minutos a 500 g y si fuese sangre total se homogenizará durante 20 minutos. Después se diluye en modificador de matriz 1/9 (v/v) y se homogeniza.

La muestra de orina debe ser de 24 horas. La presencia de hematuria interfiere la determinación. Se toma una muestra y se centrifuga 500 g durante diez minutos. Se diluirá 1/4 (v/v) con modificador de matriz.

3.12.4. Preparación de estándares

Se parte de un patrón certificado de 1 g/l, diluido hasta una concentración de 10 mg/l, se almacena en nevera (estable tres meses). Se preparan los estándares diluidos en modificador de matriz 1/9 (v/v) con concentraciones finales de 0,63, 1,26 y 2,53 umol/l.

El blanco se prepara con agua suprapura y modificador 1/9 (v/v). En caso de hacer una calibración para orina, el blanco se preparará con agua suprapura y modificador 1/4 (v/v).

3.13. Intervalos de referencia (36)

Muestra	Número	Selenio (ug/l)	Media ± 2DS
Neonatos 0-28 días	247	31,20	14,70-44,66
Niños 29 días-1,9 años	17	51,24	20,38-82,09
Niños 2-10 años	44	71,63	49,16-91,09
10-20 años	24	78,02	54,32-101,71
21-40 años	86	76,44	53,60-99,27
41-60 años	72	77,85	51,89-103,80
61-80 años	95	73,40	42,47-104,32
Más de 80 años	20	62,94	34,55-91,32

BIBLIOGRAFÍA

1. Tohmson CD. Assessment of requirements for selenium and adecuacy of selenium status: a review. Eur J Clin Nutr 2004; 58: 391-402.

2. Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs Toxicity. Regulatory, Toxicology and Pharmacology 2003; 38: 232-42.

3. Combs GF, Jr and Gray WP. Chemopreventive agents: selenium. Pharmacol Ther 1998; 79: 179-92.

4. McKenzie RC, Raffertty TS, Beckett GJ. Selenium: an essential element por inmue function. Immunol Today 1998; 19: 342-5.

5. Keshan disease research group of the chinese academy of medical sciences. Observations on effect of sodium selenite in prevention of Keshan disease. Chin Med J 1979, 92: 471-482.

6. Robinson MF, Camplbell DR, Steward RD, *et al.* Efect of daily supplements of selenium on patients with muscular complaints in Otago and Canterbuty. NZ Med J 1981; 93(683): 289-292.

7. De Rayman MP. Química clínica de elementos traza en nuestra comunidad, el selenio. Discurso de ingreso a la academia de ciencias exactas, físicas, químicas y naturales de Zaragoza, Ángel García de Jalón, 2001.

8. Klein EA. Glickman Urologic Clinical Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland Ohio. J of Urology 2004;171:S50-53.

9. Brooks JD, *et al.* Plasma selenium level before diagnosis and the risk of prostate cancer development. J Urol 2002 aug. 168(2), discussion 662.

10. Wei WQ, *et al.* Pospective study of serum selenium concentrations and esophgeal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. Am J Clin Nutr 2004; 79: 80-85.

11. Beno I, *et al.* Blood levels of natural antioxidants in gastric and colorectal precancerous lesions and cancers in Slovakia. Neoplasma 2000; 47(1): 37-40.

12. Kiremidjian-schumacher L, *et al.* Selenium and immuno competence in patients with head and neck cancer. Biol Trace Elem Res 2000 feb 73(2); 97-111.

13. Rostkowska-Nadolska B, *et al.* Content of trace elements in serum of patients with carcinoma of the larynx. Arch Mmunol Ther Exp (warsz) 1999, 47(5); 321-5.

14. Huang YL, *et al.* Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. Clin Biochem 1999 mar 32(2): 131-6.

15. Pazirandeh A, *et al.* Determination of selenium in blood serum of children with acute leukemia and effect of chemotherapy on serum selenium level. J Trace Elem Med Biol 1999 dec,13(4): 242-6.

16. Gohse A, *et al.* Enhanced sensitivity of human oral carcinomas to induction of apoptosis by selenium copounds, involvement of mitogen-antivated protein kinase and Fas pathway. Cancer Res 2001 oct15, 61(20): 7479-87.

17. Alaejos MS, *et at.* Selenium and cancer. Some nutrional aspects. Nutrition 2000 may 16(5): 376-83.

18. Backovic D, *et al.* Blood selenium in healthy persons and individuals with malignant diseases. Srp Arh Celok Lek 1998 Jan-Feb 126(1-2): 18-22.

19. Gey KF. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A cardiovascular disease and cancer. Biofactors 1998; 7: 113-114.

20. Kose K *et al.* Plasma selenium levels in rheumatoid arthritis. Biol Trace Elem Res. 1996; 53: 51-6.

21. Aaseth J *et al.* Rheumaoid arthritis and metal compounds perspectives on the role of oxygen radical detoxificación. Anlyst 1998; 123: 3-6.

22. Singhal N and Austin J. Clinical review of mcronutrients in HIV infection. J Int Assoc Physicians AIDS Care 2002; 1: 63-75.

23. Patrick L. Nutrients anh HIV, part one. Beta cvarotene and senium. Altern Med Rev 1999; 4: 403-13.

24. Kucharzewski M *et al.* Concentration of selenium in the whole blood and the thyroid tissue of patients with various thyroid diseases. Biol Trace Elem Res 2002 jul; 88(1): 25-30.

25. Scolapio J S, *et al.* Selenium concentrations in pancreatic juice of patients with chronic pancreatitis. J Parenter Enteral Nutr 2004 Sep-oct; 28(5): 339-41.

26. Ania C Muntau, *et al.* Age-related reference values for serum selenium concentrations in infants and children. Clin Chem 2002; 48: 555-560.

27. Institute of medicine, food and nutrition board. Dietary reference intakes: vitamin C, Vitamin E, Selenium and carotenoids. National academy press, Washington, DC 2000.

28. Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs Toxicity. Regulatory toxicology and pharmacology 2003; 38323-42.

29. US department of agriculture, agricultural research service. 2003 USDA National nutrient database for standard reference, release 16. Nutrient data Laboratory home page <http:/www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.

30. Bagnall KW. The chemistry of selenium, tellurium and pollonium. Amsterdan: Elsevier, 1966.

31. Radzouk T, *et al.* Chemical modification and spectral interferences in selenium determination using Zeeman-effect electrothermal atomic absorption spectrometry. J Anal at Spectrom 1992; 7,397-403.

32. Feuerstein M, *et al.* Determination of Se in human serum by GFAAS with transversely heated graphite atomizer and longitudinal Zeeman-effec backgrround correcciton. Atomic spectroscopy 1999; 20(5): 180-5.

33. Lindber I, *et al.* Direct determination of selenium in solid biological materials by graphyte furnace atomic absorption spectrometry. J Anal at Spectrom 1988; 3: 497-501.

34. Fuerstein M, *et al.* Determination of Se in human serum by GFAAS with transversely geatd graphite atomizer and longitudinal Zeeman-effect background correction. Atomic spectroscopy 1999; 20(5); 180-5.

35. Montel A, *et al.* Evaluación de un método para la determinación de selenio en sangre total. Quím clin 1998; 17: 88.

36. García de Jalón A. Química Clínica de elementos traza en nuestra comunidad; el selenio. Valores de selenio sérico en la población normal de Zaragoza. En discurso de ingreso. 29 de noviembre de 2001.