

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS CLINICAS VETERINARIAS

**EFEECTO DE LA ADMINISTRACION ORAL DE SELENIO
METIONINA/CISTEÍNA SOBRE LA ACTIVIDAD DE GLUTATION
PEROXIDASA ERITROCITICA EN CABALLOS CRIOLLO CHILENO.**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO
DE MÉDICO VETERINARIO

SERGIO TOBIAS LABBE DANIEL

VALDIVIA – CHILE

2005

INDICE

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y METODOS.....	11
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSION.....	16
7. BIBLIOGRAFIA.....	18
8. ANEXOS.....	23
9. AGRADECIMIENTOS.....	25

1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue medir, en caballos Criollo chileno selenio deficientes, la respuesta a la dosificación oral de una dosis única de un producto comercial con sales de seleniometionina/seleniocisteína (Selplex-50®), mediante determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-px) eritrocítica durante noventa días.

Como material biológico se utilizaron 21 caballos Criollo chileno, machos y hembras, de entre tres y veinte años de edad, todos selenio deficientes y alimentados sólo bajo régimen de pastoreo directo. Se dividieron en tres grupos: Grupo I (n=7) tratado con seleniometionina/cisteína en dosis de 4g/caballo/día por 15 días; Grupo II (n=7) tratado con el mismo producto, a la misma dosis, pero por un periodo de 30 días y Grupo Control (n=7), el cual no recibió ningún tipo de tratamiento.

Se tomó muestras de sangre heparinizada al comienzo de la experiencia, y a los treinta, sesenta y noventa días post tratamiento.

A los 30 días post tratamiento se detectó una marcada disminución en la actividad eritrocítica de GSH-px del Grupo I, lo que fue atribuido a que en este grupo existían tres yeguas gestantes, lo cual no fue considerado al inicio de la experiencia. En atención a este hallazgo, no fue posible realizar un análisis estadístico entre este grupo y los demás grupos. En el grupo II y en este mismo muestreo, la actividad eritrocítica de GSH-px del grupo II se mantuvo en el mismo rango de deficiencia que al inicio de la experiencia (día 0). Entre los treinta y sesenta días, existió un aumento de la actividad enzimática de GSH-px en este grupo, no observándose diferencias significativas ($p>0,05$) dentro del grupo, ni tampoco con respecto al grupo control. Entre los sesenta y noventa días de iniciado el tratamiento la actividad de GSH-px disminuyó en relación al nivel de actividad alcanzado a los sesenta días, no observándose diferencias significativas en el grupo, ni tampoco con el Grupo Control.

Se concluye, que la administración oral de selenio orgánico (seleniometionina/seleniocisteína), a una dosis diaria de 4 g/caballo/día por 30 días, incrementa y mantiene la actividad de GSH-px eritrocítica sobre valores mínimos de referencia por al menos 60 días en caballos Criollo chileno selenio deficientes.

Palabras claves: Selplex- 50, glutatión peroxidasa, caballos selenio deficientes, selenio orgánico, caballos Criollo chileno.

2. SUMMARY

EFFECT OF THE ORAL DOSIFICACION OF METIONINE/CISTEINE SELENATE IN THE ERITROCYTIC GLUTATHION PEROXIDASE ACTIVITY IN CHILEANS HORSES.

The objective of this study was to measure the response to the oral dosification of metionineselenate/cisteineselenate (Selplex 50) using erythrocytic glutathion peroxidase (GSH-px) activity as indicator on selenium deficient horses.

Twenty one Chilean horses, between three and twenty years old, low erythrocytic GSH-px activity and under pasture feeding were used. They were divided into three different groups, the first one (n=7) received a single dose of 4g/horse/day of metioninselenate/cisteinselenate for fifteen days long, the second one (n=7) received the same dose but for thirty days long.

Heparinized blood was obtained at the beginning of experiment and thirty, sixty and ninety days after treatment.

Thirty days after treatment, a significant decrease in the erythrocytic activity of GSH-px in Group I was detected, this wasn't considered at the beginning of the experiment. Because of this finding it wasn't possible to performe estadistical analysis between this Group and the others.

Thirty days after treatment, erythrocytic GSH-px activity of Group II kept the same reference that the start of the experiment (day 0). At sixty days there was a rise in the GSH-px activity in this group, not showing statistical significant differences ($p>0,05$) within group neither against Control Group. Between sixty and Ninety days after treatment, erythrocytic GSH-px activity diminish in relation to the activity level at sixty days, not showing statistical significant differences ($p>0,05$) withing or between groups.

It is concluded, that oral administration of organic selenium (metionineselenate/cisteineselenate), at a daily dose of 4 gr/horse/day for thirty days, rises and keeps erythrocytic GSH-px activity over minimal reference values for at least sixty days in selenium deficient Chilean criollo horses.

Key words: Selplex-50, glutathion peroxidase, selenium deficient horses, organic selenium, Chilean horses.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Selenio.

Existen en la naturaleza diversos tipos de minerales indispensables para la vida de los animales, dentro de los cuales se encuentran los macrominerales, como calcio, sodio, fósforo, magnesio y potasio, y los llamados minerales traza, tales como zinc, cobre, cobalto, yodo y selenio (Ceballos y Wittwer, 1996). Entre estos, el selenio es un mineral que fue primero descrito por Franke y Painter (1935), y cuya toxicidad está asociada a la llamada “enfermedad por álcali” y a la “ceguera tambaleante del ganado” (Blood y Radostits, 1992).

Varias enfermedades de los animales son causadas por la deficiencia de selenio, de vitamina E y por la asociación de ambas. Estas enfermedades están generalmente relacionadas con factores como una dieta rica en ácidos grasos insaturados, ejercicio no acostumbrados y el crecimiento rápido de animales jóvenes (Blood y Radostits, 1992); como también por la ingesta de forrajes o suelos que contienen altas cantidades de hierro o azufre (Heath, 1995), este último inhibiendo la incorporación de selenio en la planta y por lo tanto su absorción en los animales (Lofstedt, 1997).

Las plantas contienen diferentes compuestos de selenio, como por ejemplo selenato, seleniocisteína, seleniometonina (selmet), seleniohomocisteína, se-metilseleniocisteína, seleniocistationina, dimetilseleniuro, dimetilseleniopropionato, etc. Excepto por el selenato, seleniocisteína, selmet y dimetilseleniuro, todos estos selenio compuestos son selenio aminoácidos no proteicos, por lo tanto estos últimos son la forma predominante de selenio presente en las plantas (Whanger, 2003). Por otra parte, las leguminosas contienen niveles más bajos de Se que las gramíneas; siendo además, muy probable encontrar niveles más bajos de Se en épocas de gran crecimiento de los pastos (Lofstedt, 1997).

También es común observar una deficiencia de selenio en potrillos de yeguas que recibieron una suplementación mineral inadecuada durante la gestación (Wintzer, 1986; Moore y Kohn, 1991).

El requerimiento de Se de un caballo es de 2.4 ug /kg. de peso vivo (Stowe, 1967), y en cuanto al contenido de Se en granos y forrajes se considera adecuado una concentración superior a 0.1 mg/kg. (Blood y Radostits, 1992).

El rol bioquímico del selenio se manifiesta, entre otras, a través de la enzima Glutación Peroxidasa (GSH-px), de la cuál el es componente (Rotruck y col, 1973). Es incorporado en esta enzima en las células hematopoyéticas después de la absorción (Ishii y col, 2002).

El selenio es también componente de otras proteínas, como selenio proteínas del músculo, selenoflagellin y de enzimas bacterianas (Blood y Radostits, 1992). Además, forma parte de la estructura de proteínas similares al citocromo C, está relacionado con la presencia del citocromo P-450, es parte de la selenoproteína P, y regula el metabolismo de algunos aminoácidos. Junto con lo anterior, la conversión de tetraiodotironina a triiodotironina en los tejidos, principalmente en hígado, es un proceso catalizado por una enzima selenodependiente, la 5-deiodinasa (Ullrey, 1992).

La actividad de la GSH-px en los eritrocitos tiene una relación positiva con la concentración de selenio sanguíneo en los vacunos, ovejas y equinos; siendo por lo tanto de ayuda la determinación de esta enzima para el diagnóstico de la deficiencia de este mineral (Blood y Radostits, 1992).

El selenio y la vitamina E funcionan juntos para proteger y estabilizar membranas celulares, incluyendo membranas de células musculares. Una inadecuada actividad antiperoxídica causa incremento del peróxido tisular, alteración en el metabolismo celular y destrucción de la célula (Dill y Redhun, 1985).

La vitamina E es un antioxidante liposoluble, la cuál no es sintetizada por el cuerpo sino que debe ser aportada por el alimento, en cambio el selenio forma parte de la enzima GSH-px, la cuál es hidrosoluble y producida por el mismo organismo. La vitamina E actúa en la prevención de la peroxidación convirtiendo el radical libre en hidroperóxido y la GSH-px dependiente del selenio, es la responsable de la detoxificación de este hidroperóxido (Surai, 2003).

La absorción de selenio en animales monogástricos se lleva a cabo principalmente en el yeyuno. El selenio en forma de seleniometonina se absorbe mediante un mecanismo de transporte activo, lo cual ha sido demostrado en estudios realizados en intestino delgado de hámster (Wright y Bell, 1966). De igual forma, estos mismos autores determinaron que la selenocisteína y el selenito se absorben por difusión pasiva, mientras que el selenato es absorbido mediante transporte activo por la bomba Na+K+ATPasa.

Después de ser absorbido, el Se se une a proteínas transportadoras para ser llevado al hígado, siendo la albúmina la principal proteína transportadora, ligándose a ella un 80% de la cantidad de Se administrado. Para lograr una adecuada absorción y transporte de este mineral, se requiere una concentración sanguínea que oscile entre 0.47 y 1.4 $\mu\text{mol/l}$ (Stowe y Herdt, 1992).

Luego de ser llevado al hígado, ligado a albúminas y volver a la circulación sanguínea, el selenio es distribuido para almacenarse principalmente en tejidos de composición proteica (Krishnamurti y col., 1989). Previa incorporación del mineral a los diferentes tejidos donde ejerce su acción, el Se es reducido a selenido e incorporado a selenocisteína, aminoácido que forma parte de la estructura de la enzima GSH-px (Gerloff, 1992). La excreción de selenio se realiza por las vías fecal, urinaria, biliar, salival, pulmonar y láctea (Krishnamurti y col., 1989).

Generalmente el diagnóstico de la deficiencia de selenio se hace en base a hallazgos clinicopatológicos y por la respuesta al tratamiento con selenio-vitamina E (Blood y Radostits, 1992), pero también es posible hacer una buena estimación a través de la determinación de GSH-px eritrocítica (Maylin y col., 1980).

3.2. Glutación Peroxidasa.

La GSH-px es una metaloenzima que forma parte del sistema glutatión, señalado este como el principal sistema antioxidante en el organismo. La enzima tiene un peso molecular aproximado de 80.000 Daltons, esta conformada por cuatro subunidades y contiene cuatro átomos gramos de selenio por cada mol de enzima. La GSH-px esta contenida en el interior de los glóbulos rojos, a los que se incorpora sólo durante la eritropoyesis (Oh y col., 1974) y contiene el 75% del selenio sanguíneo.

La medición de la actividad de la enzima antioxidante GSH-px, es útil para determinar la deficiencia de selenio, ya que esta enzima esta estrechamente relacionada ($r = 0,94$) con los niveles séricos de selenio (Maylin y col., 1980), aumentando su actividad enzimática en la sangre no antes de 4-6 semanas después de la administración de selenio (Blood y Radostits, 1992).

La GSH-px tiene un rol protector a nivel de las membranas celulares, donde destruye los peróxidos, superóxidos y radicales hidroxílicos. La deficiencia de selenio y vitamina E permite la acumulación y acción de estas sustancias, llevando a la destrucción de la membrana celular, proceso al cual las células del músculo esquelético están particularmente expuestas. Los peróxidos libres, superóxidos y radicales hidroxílicos, causan lipoperoxidación de la membrana celular al reaccionar con ácidos grasos no saturados, lo cual lleva a la producción de hidroperóxidos (McMurray y Rice, 1982). Si estos peróxidos no son removidos o inactivados, fragmentan las membranas celulares y producen la liberación de enzimas lisosomales, las que a su vez producen destrucción celular (Moore y Kohn, 1991).

Por otra parte, la GSH-px interviene en la cascada de reacciones que catalizan la formación de prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (Ceballos y col., 1996) y también se relaciona con el normal funcionamiento del sistema inmunológico y con la integridad funcional del tracto reproductivo tanto en machos como en hembras (López Alonzo y col., 1997).

La concentración sanguínea de GSH-px tiene un amplio rango de referencia, es así como Blood y Radostits (1992), consideran en el ganado bovino concentraciones menores a 30 mU /mg Hb como deficientes; marginal entre 30-60 mU/mg Hb y adecuadas si son mayores a 60 mU/mg Hb. Por otra parte, en el Laboratorio de Patología Clínica de la Universidad Austral de Chile, los valores de referencia para el equino van de un mínimo de 130 U/g Hb a un máximo de 600 U/g Hb.

Según Caple y col. (1978), no todos los potrillos con disminución de la actividad de la GSH-px desarrollan signos de alguna enfermedad asociada a la deficiencia de selenio, lo que hace más difícil el diagnóstico de los cuadros deficitarios, ya que algunos de ellos tienen una presentación subclínica.

3.3. Esteatosis.

La esteatosis es una enfermedad de origen nutricional, y obedece principalmente a una deficiencia de selenio y vitamina E (α -tocoferol) (Dood y col., 1960; Owen y col., 1977; Maylin y col., 1980; Beech, 1988; Osame y col., 1989; Freestone y Carlson, 1991; Moore y Kohn, 1991). El curso de la enfermedad puede ser agudo, subagudo o en forma insidiosa (Moore y Kohn, 1991).

El término esteatosis, también conocido como esteatitis o enfermedad de la grasa amarilla, es derivado de una decoloración amarillenta producida en el tejido adiposo, a consecuencia de una degeneración del mismo y el cuál es reemplazado por tejido conectivo con depósitos de calcio (Wintzer, 1986). La oxidación del tejido graso conlleva a la producción de peróxidos, los cuales producen necrosis acompañada de la subsecuente inflamación (White, 1993).

La esteatosis como enfermedad clínica espontánea se ha descrito en caballos (Hartley y Dood, 1957; Wensvoort y Steenberg-Botterweg, 1975), cerdos (Vitovec y col., 1975), gatos (Jubb y Kennedy, 1970; Smith y col., 1972; Munson y col., 1958), conejos (Jones y col., 1969) y hurones (Jubb y Kennedy, 1970; Smith y col., 1972). En Chile ha sido descrita en caballos por Araya y Vits (1998) y Araya y col. (2004).

La afección puede estar asociada con la llamada enfermedad del músculo blanco, conocida también como miodegeneración nutricional, miopatía nutricional o miodegeneración distrófica (Moore y Kohn, 1991; Ceballos y col., 1996). La enfermedad raramente afecta animales adultos, siendo más común su presentación en potrillos en especial los dos primeros meses de vida (Beech, 1988). Sin embargo, Ceballos y col (1996), informan de enfermedad de la grasa amarilla en un caballo de 18 meses y Taylor y col (1988) reportan un caso en un pony de 5 años.

La esteatosis en los potrillos se puede presentar como una caquexia generalizada consecuente a la afección solamente de la grasa o secundaria a una miopatía (Hartley y Dood, 1957; Kroneman y Wensvoort, 1968). Los principales signos clínicos son: edema ventral, dificultad en el desplazamiento, decúbito permanente y muerte repentina (Beech, 1988; Osame y col., 1989). Un signo importante lo constituye la aparición de aumentos de volumen, de tamaño y forma variable, en la región cérvico dorsal, lo cuál impide que el animal pueda realizar los movimientos propios de la nuca y el cuello (Beech, 1988; Freestone y Carlson, 1991; Moore y Kohn, 1991; Araya, 2003). También se pueden observar problemas respiratorios y disfagia, la cuál puede llevar a neumonía por

aspiración. Los potrillos mayores presentan letargia repentina, rigidez al caminar, con decúbito y muerte por edema pulmonar y falla cardíaca. Puede observarse aumentos de volumen subcutáneo, firmes y dolorosos, especialmente sobre grupa, cresta nugal y pared abdominal. En caballos adultos se ha observado cólico, edema de la cabeza y cuello, rigidez muscular, falla cardíaca y mioglobinuria (Owen y col., 1977). También se ha reportado que la enfermedad curse sin la presentación de signos clínicos (Wilson y col., 1976; Moore y Khon, 1991), y sólo se aprecia mal rendimiento al ejercicio y en algunos casos, leve incoordinación post ejercicio.

En esta enfermedad hay un aumento de la actividad de aspartato aminotransferasa y creatino fosfoquinasa sérica (Wilson y col., 1976; Owen y col., 1977; Wintzer, 1986; Beech, 1988; Osame y col., 1989; Contreras y col., 1991; Moore y Kohn, 1991), pero no puede tomarse este resultado como definitivo de la presencia de esteatosis, pues hay estados fisiológicos o patológicos diferentes que de igual manera pueden alterar la actividad de estas enzimas (Godeau, 1992; Grimminger-Heigl, 1993). Por esta razón, se señala que sólo es de ayuda para establecer el diagnóstico la medición de la actividad sérica de estas enzimas (Ceballos y col., 1996).

Al examen post mortem se ha observado necrosis difusa de los adipositos, con depósito mineral en la grasa. Las áreas afectadas se encuentran rodeadas de macrófagos con abundantes vacuolas en el citoplasma. El citoplasma de macrófagos y adipositos degenerados se tiñen de un color amarillo castaño a la tinción de hematoxilina eosina (Foreman y col., 1986). También ocurre daño a nivel de los adipositos mesentéricos, por lo tanto la muerte se puede explicar como una progresiva caquexia dado la mala absorción causado por la inhabilidad del intestino de funcionar normalmente (Hartley y Dood, 1957; Dood y col., 1960; Platt y Whitwell, 1971). En algunos casos se puede presentar una anemia normocrómica (Wintzer, 1986), como también la llamada necrosis de Zenker de la lengua (Ceballos y col., 1996).

Histológicamente en la esteatosis, el tejido adiposo afectado se caracteriza por depósitos intersticiales de pigmentos ceroides, originados de la peroxidación lipídica, condición que da el aspecto amarillento anaranjado de la grasa. Las células inflamatorias infiltradas consisten en neutrófilos y macrófagos que ingieren los pigmentos. También están presentes linfocitos, células plasmáticas y células gigantes, acompañado de fibrosis (White, 1993).

El diagnóstico definitivo de deficiencia de selenio se establece determinando la actividad de GSH-px eritrocítica (Foreman y col., 1986), ya que como se ha dicho, existe una correlación positiva entre la actividad de ella y los niveles sanguíneos de selenio.

3.4. Enfermedad del músculo blanco.

La enfermedad del músculo blanco o miodegeneración nutricional ha sido reportada en varias especies de animales, tales como aves (Gill y col., 1980), bovinos (Hoshino y col.,

1989; Kursa, 1975), caballos (Lofstedt, 1997) y ovejas (Osame y col, 1990). Esta alteración, al igual que la esteatosis, ocurre por una inadecuada dieta de selenio y vitamina E; describiéndose una cierta estacionalidad de la enfermedad, con mayor incidencia en los meses de concentración de los partos (Dill y Redhun, 1985). Según Dood (1972), afecta a los potrillos desde el nacimiento hasta aproximadamente los 7 meses de edad. Sin embargo, existen animales selenio deficientes que no presentan signos clínicos, lo que indica que se requieren también otros factores para la presentación de la enfermedad, tales como: crecimiento excesivo, estrés, ejercicio desacostumbrado, deficiencia de vitamina E y dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Lofstedt, 1997).

La miodegeneración nutricional cursa con una disfunción muscular, siendo los músculos mayormente afectados los de los miembros, intercostales, cervicales, diafragma, miocardio y lengua (Dill y Redhun, 1985).

El diagnóstico de esta miodegeneración en herbívoros está basado en los hallazgos clínicos, resultados de laboratorio, hallazgos patológicos y respuesta a la terapia con vitamina E y selenio (Owen y col., 1977).

Los signos clínicos más relevantes son los musculares, con imposibilidad de los animales de mantenerse de pie, rigidez muscular; disfagia en algunos casos, en que los potrillos después de mamar tienen regurgitación nasal u oral de la leche. El aumento de la frecuencia respiratoria y de la cardíaca ocurre en la mayoría de los casos (mayor a 80 Lat./min.) (Dill y Redhun, 1985).

Microscópicamente, se observan lesiones inflamatorias en el músculo esquelético, fragmentación de la fibra muscular, marcada degeneración hialina y granular en la mayoría de las fibras. En algunos casos también se puede encontrar mineralización en la fibra muscular degenerada (Wilson y col., 1976).

Los radicales libres ejercen su acción patógena dañando la integridad de las membranas celulares, puesto que se fijan a un carbono de la cadena alquilo ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$) de un ácido graso, iniciando la peroxidación lipídica. Los ácidos grasos poliinsaturados se fragmentan debido al carbono que se ha transformado en radical libre, con lo cual las estructuras fosfolipídicas de las membranas se desorganizan y destruyen (López Alonso y col., 1997).

Se ha demostrado el incremento de la peroxidación lipídica en el músculo antes y después del desarrollo de lesiones visibles en la distrofia muscular enzoótica en terneros, lo cual confirma que la destrucción de las células musculares debido a la peroxidación lipídica es la principal causa de esta miopatía (Lofstedt, 1997).

Al examen postmortem, se encuentran zonas necróticas que confirman la degeneración muscular, la cual es demostrada por decoloración pálida de la fibra muscular, calcificaciones longitudinales y edema intramuscular. Estas líneas blancas corresponden a necrosis de coagulación de la banda muscular. También es común encontrar infiltración con macrófagos y células mononucleares (Dill y Redhun, 1985). Según estos mismos autores,

como consecuencia del daño muscular es común encontrar mioglobinuria en el análisis urinario y ocasionalmente, se presenta necrosis tubular producto del efecto tóxico de la mioglobina sobre las células epiteliales renales.

El diagnóstico definitivo, al igual que la esteatosis, se establece determinando la actividad de GSH-px eritrocítica, siendo de gran ayuda la evidencia de los signos clínicos y de menor importancia la evaluación en la actividad sanguínea de enzimas, tales como CK, AST y LDH. Otros hallazgos de laboratorio incluyen anomalías como mioglobinuria, hiperkalemia, hiponatremia e hipocloremia (Hodson, 1998).

3.5. Tratamiento.

La prevención y el tratamiento de la deficiencia de selenio se realiza mediante la suplementación de selenio, existiendo en el mercado una diversidad de alternativas, entre las cuales se cuentan: bloques de sal y polvos que incluyen selenio orgánico o inorgánico, fertilización de las praderas con selenio (Hintz, 1999), inyecciones de selenito de sodio (Dill y Redhun, 1985) y selenato de bario (Witchel y col., 1998; Urzúa, 2001; Araya y col., 2004). Las concentraciones de selenio en el neonato dependen de los niveles maternos durante la gestación. De la misma manera el traspaso de selenio en el calostro y la leche no son suficientes para prevenir la miodegeneración, es por ello que al nacimiento debe haber una concentración suficiente de Se, dado por una adecuada suplementación a la madre durante la gestación (Lofstedt, 1997).

Existen principalmente tres estrategias de suplementación con Se:

- A las madres durante el último tercio de gestación vía oral, ya que es más eficaz la transferencia de selenio hacia el feto, utilizando selenioaminoácidos (metionina/cisteína), en comparación con el uso de compuestos inorgánicos (Dill y Redhun, 1985).
- A las madres durante el último tercio de preñez vía parenteral, describiéndose distintos protocolos para la administración de selenito de sodio (Lofstedt, 1997).
- A los potrillos recién nacidos vía parenteral usando también selenito de sodio (Lofstedt, 1997).

Mientras que el selenio puede ser utilizado como selenito de sodio, algunos reportes indican que la retención de selenio de fuentes naturales es mayor (Cole, 1994), y también la forma orgánica de selenio hallada en selenio levadura es más disponible biológicamente y tiene niveles más altos de bioactividad que los componentes inorgánicos de selenio (Coombes y Coombes, 1986).

Por otra parte, las inyecciones de selenito de sodio son irritantes, y debido a que deben repartirse en dos o más puntos de aplicación, observándose en ocasiones reacciones inflamatorias locales y/o sistémicas, así como también shock anafiláctico (Moore y Kohn,

1991). Por esta razón parece interesante determinar la efectividad del empleo por vía oral de selenoaminoácidos en caballos selenio deficientes.

3.6. Hipótesis.

La suplementación oral de seleniometionina/seleniocisteína en caballos selenio deficientes, logra incrementar y mantener la actividad de GSH-Px eritrocítica dentro del rango de referencia, al menos por 90 días.

3.7. Objetivos

Evaluar por un periodo de 90 días el incremento de la actividad de GSH-px eritrocítica en caballos selenio deficientes, suplementados con un producto comercial en base a sales de seleniometionina / seleniocisteína por un período de 15 y 30 días.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material

De dos criaderos de caballos Criollo chileno, con antecedentes previos de deficiencia de selenio, se seleccionó 21 caballos selenio deficientes, condición manifestada por una baja actividad de GSH-px eritrocítica al examen de sangre. Los animales pertenecían a ambos sexos, con edades de entre tres y veinte años.

Ambos criaderos se ubican en la región de Los Lagos (X), uno en la comuna de Osorno, 20 km. en dirección noroeste de la ciudad, y el otro ubicado en la comuna de San Pablo, 22 km. en dirección noreste de la ciudad de Osorno.

Los animales se asignaron en 3 grupos de 7 caballos cada uno, según la actividad de GSH-px eritrocítica. El grupo I recibió suplementación con selenio por un lapso de 15 días. El grupo II recibió suplementación con selenio por un lapso de 30, y el grupo III permaneció como control sin recibir ningún tipo de tratamiento.

El producto utilizado fue Selplex 50®, el cuál contiene 1000ppm de selenioproteínas (50% seleniocisteína y 50% seleniometionina). Para la aplicación del producto, este se disolvió en 20 ml de agua y se administró con una jeringa de dosificación oral.



® Selplex 50, Laboratorio Alltech, Chile.

4.2. Métodos

Una vez determinados los grupos de suplementación, se comenzó el tratamiento (día 0) en los diferentes grupos de la siguiente manera:

El grupo I recibió suplementación con seleniometionina/cisteína (4 g/caballo/día de Selplex) por un periodo de 15 días.

El grupo II recibió suplementación con seleniometionina/cisteína (4 g/caballo/día de Selplex) por un periodo de 30 días.

El grupo III se empleó como control y no recibió ningún tipo de suplementación.



Todos los caballos fueron mantenidos a pastoreo directo, en praderas naturales, a lo largo de toda la experiencia

Se tomaron muestras de sangre heparinizada de cada caballo mediante venopunción yugular al inicio de la experiencia (día 0), y luego, a los treinta, sesenta y noventa días de iniciado el tratamiento. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile inmediatamente posterior a su recolección, en un envase refrigerado.

La actividad de GSH-px eritrocítica se determinó mediante una técnica cinética NADH-dependiente (Plagia y Valentine, 1967) usando un reactivo comercial. Los análisis de hemoglobina se realizaron en un fotómetro semiautomático Hitachi 4020 con una longitud de onda de 546 nanómetros.

4.2.1. Método estadístico

Los datos fueron ordenados en base a tablas y gráficos. Los resultados obtenidos en cada tratamiento fueron expresados como medias aritméticas y sus desviaciones estándares. Las variables fueron evaluadas para su normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La homocedasticidad de las varianzas fue determinada mediante el test de Levene. Dependiendo de los resultados obtenidos se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía y los tests de comparación múltiple correspondientes. Se utilizó el programa estadístico SPSS 8.0.

5. RESULTADOS

Los hallazgos encontrados en el Grupo I, en relación a la abrupta caída observada en la actividad de la enzima GSH-px desde el día 0 hasta el día treinta de iniciado el tratamiento, los cuales fueron atribuidos a que en este grupo existían tres yeguas gestantes, hace que no sea posible comparar este grupo con los otros grupos, por lo tanto no es posible realizar un análisis estadístico entre este grupo y los demás grupos. Por lo tanto, las comparaciones se harán sólo entre el Grupo II referente al Control, efectuándose sólo una comparación entre los grupos al inicio de la experiencia

5.1 Determinación de la actividad de GSH-px

Al inicio de la experiencia (día 0), se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) en relación a la actividad de la enzima GSH-px entre los diferentes grupos. (Fig 1)

La actividad eritrocítica de GSH-px del Grupo I disminuyó a los treinta días post tratamiento, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) con referencia a los valores obtenidos el día 0 del mismo grupo. A los sesenta días post tratamiento, en este grupo existió un leve aumento de la actividad de GSH-px, pero sin ser este significativo dentro del grupo (Fig1). A los 90 días, la actividad de la GSH-px se mantuvo en el Grupo I en relación a los 30 y 60 días.

A los treinta días post tratamiento, la actividad eritrocítica de GSH-px del Grupo II se mantuvo en el mismo rango de deficiencia que al inicio de la experiencia (día 0), existiendo un aumento de la actividad sérica de GSH-px a los 60 días en este grupo, no observándose diferencias significativas dentro del grupo, ni tampoco con respecto al Grupo Control. A los noventa días de iniciado el tratamiento, la actividad de GSH-px disminuyó en relación al nivel de actividad alcanzado a los sesenta días, no observándose diferencias significativas en el grupo, ni tampoco entre este grupo y el Control.

En el grupo Control, si bien es cierto se evidenció un leve incremento en la actividad de la GSH-px, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los valores iniciales (día 0) y los obtenidos a los treinta, sesenta y noventa días en relación a la actividad de la enzima, como tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativa entre los diferentes muestreos a lo largo de toda la experiencia.

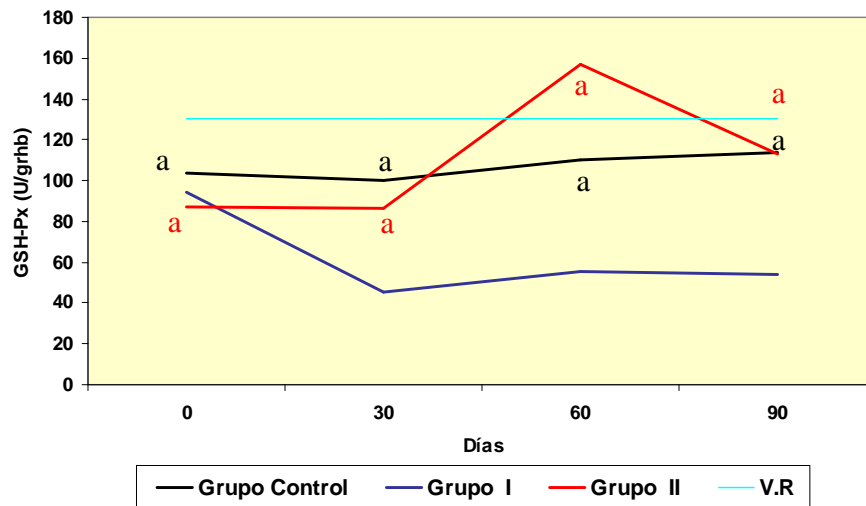


Fig 1. Actividad promedio de GSH-px eritrocítica en caballos Criollo chileno y diferencias entre grupos tratados y grupo control al inicio de la experiencia, a los treinta, sesenta, noventa días post tratamiento.

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

Tabla 1. Valores promedio \pm d.e. en la actividad de GSH-px en caballos Criollo chileno dentro de cada grupo para cada muestreo.

	0	30	60	90
I	94 \pm 26,4	45 \pm 41,1	55,7 \pm 37,2	54 \pm 20,6
II	87,4 \pm 34,3	86,2 \pm 78,9	157 \pm 72,8	113,1 \pm 97,7
Control	103,4 \pm 22,2	100 \pm 18,6	110 \pm 14,5	113,7 \pm 15,5

6. DISCUSIÓN

La abrupta caída observada en la actividad de la enzima GSH-px desde el día 0 hasta el día treinta de iniciado el tratamiento en el grupo I (luego de la dosificación con selenio orgánico por 15 días (seleniometonina/selenicisteína) fue algo inesperado. Este hecho se podría atribuir a que en este grupo se incluyeron involuntariamente dos yeguas con gestación avanzada y una lactante, lo cual se debió a que al seleccionar los animales no se realizó un examen de gestación en los animales. En cambio los animales del Grupo II y III (Control) solamente incluía caballos jóvenes (3-5 años) y yeguas no gestantes y no lactantes. La disminución en la actividad de la GSH-px en los caballos del Grupo I, se podría deber a que en este grupo se habría producido un traspaso de selenio hacia los fetos (Dill y Redhun, 1985), además de una pérdida de este por excreción a través de la leche (Krishnamurti y col.,1989); produciéndose así la disminución de la actividad sérica de GSH-px, lo que hace que este grupo no sea comparable con el Grupo II y tampoco con el Grupo Control.

Si bien a los treinta días, la actividad de GSH-px se estabiliza en el Grupo I y tiene un leve aumento hasta alrededor de los sesenta días, sin embargo, los valores no logran llegar al rango mínimo de actividad (130 U/g Hb), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Pherson y col., (1999), en el que se comparó el uso de selenio levadura (Selplex-50) con selenito de sodio en dosis de 110 g/animal/día durante 120 días de cada producto en vacas Hereford de crianza, con el objeto de observar la diferencia en la eliminación de selenio a través de la leche, observándose que la suplementación con selenio levadura, logró concentraciones mayores de selenio en la leche que al ser suplementadas con selenio inorgánico. Este hecho concuerda y explica lo ocurrido en el Grupo I, ya que la dosis utilizada en el estudio anteriormente mencionado es de 110 g/vaca/día por 120 días, para producir un aumento en la actividad de la GSH-px en la madre, como también en el ternero a través de la leche. Entonces podemos concluir que la dosis y los tiempos de dosificación utilizada en este trabajo no habrían sido suficientes para lograr producir un aumento de la actividad de la GSH-px hasta niveles mínimos en yeguas lactantes.

En el Grupo II al contrario, no se produjo ningún cambio dentro de los primeros treinta días de iniciado el tratamiento, lo cuál concuerda con lo encontrado por Stowe y Herdt (1992), quienes sostienen que el aumento de la actividad de la enzima GSH-px sólo se manifiesta después de 4-6 semanas de iniciado la dosificación de selenio. El aumento de la actividad enzimática de GSH-px, el cuál comienza posterior a los treinta días, llegando a su máximo a los sesenta días de iniciado el tratamiento, se debe probablemente a la renovación de eritrocitos, los cuales ya han incorporado selenio durante la eritropoyesis (Ishii y col., 2002). Además, con al transcurrir de los días, aumenta aún más el número de eritrocitos que han incorporado selenio (Moore y Kohn, 1991), lo que explicaría el aumento progresivo de la actividad de la enzima hasta alrededor de los sesenta días.

La disminución de la actividad de la GSH-px que se observó a los 90 días en relación al muestreo previo, se explicaría porque el tiempo de dosificación fue muy corto (30 días), en comparación con el trabajo realizado por Pherson y col. (1999), en que el periodo de dosificación fue de 4 meses para el mismo producto.

El Grupo Control no experimentó variaciones en la actividad de GSH-px, existiendo un leve aumento hacia los noventa días, condición que se explicaría por la época del año en que se realizó el trabajo (primavera); en la cuál según Rioseco (2001), la actividad de GSH-px eritrocítica aumenta en caballos.

6.1 Conclusiones

- La administración oral de selenio orgánico (seleniometionina/seleniocisteína) a una dosis diaria de 4 g/caballo/día por 30 días, incrementa y mantiene la actividad de GSH-px eritrocítica sobre valores mínimos de referencia por al menos 60 días en caballos Criollo chileno selenio deficientes.

Sería interesante ver la factibilidad de realizar otros trabajos tendientes a comparar el efecto de la suplementación con este tipo de productos en yeguas en distintos estados fisiológicos desde el punto de vista reproductivo, como así también comparar el efecto en yeguas secas y lactantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Araya O.** 2003. Deficiencia de selenio en caballos en Chile. *Caballo chileno*. 2 (2) :13-16
- Araya O, Urzúa R., Bustamante H.** 2004. Efecto del selenato de bario inyectable sobre la actividad de Glutación peroxidasa en caballos a pastoreo. *Arch. Med. Vet.*36(1)
- Araya O, Vits L.** 1998. Esteatosis en caballos en el sur de Chile. Tercer coloquio internacional sobre équidos de trabajo, *Div. Educ. Cont., Mexico*: 329-332.
- Beech J.** 1988. Nutritional myopathy. In: Proceedings of the 10th. Bain-fallow Memorial Lectures. Equine Diagnostics and Therapeutics. Adelaide, Australia: 54-55.
- Blood R, Radostits F.** 1992. Medicina Veterinaria., 7^a ed., Ed. Interamericana, Madrid.España.
- Caple IW, Edwards SJA, Forsyth WM, Whiteley P, Selth RH, Fulton LJ.** 1978. Blood glutathione peroxidase activity in horses in relation to muscular dystrophy and selenium nutrition. *Aust. Vet. J.* 54: 57-60.
- Ceballos A, Araya O, Paredes E.** 1996. Aspectos clínico-patológico de la esteatosis en el equino: descripción de un caso. *Arch. Med. Vet.* 28:125-130.
- Ceballos MA, Wittwer FG.** 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 28: 5-18.
- Cole DJA.**1994. Toxicity test for selenium yeast. Kentucky: Alltech, p. 11.
- Coombs GF, Coombs SB.** 1986. The role of selenium nutrition. New York: Academic Press, Inc, USA.
- Contreras PA, Cubillos V, Araya O.** 1991. Enfermedad del músculo blanco en equinos: descripción de dos casos clínicos. *Patología Animal* 5: 27-31.
- Dill SG, Redhun WC.** 1985. White Muscle Disease in Foals, *Compend. Cont. Educ. Prac. Vet.* 7: 627-635.
- Dood DC.** 1972. Nutritional myopathy (nutritional muscular degeneration, white muscle disease), In: *Equine Medicine and Surgery*. Catcott E.J., Smithcors J.F. (eds). 2nd ed. American Veterinary Publications, Inc, Wheaton, Il. USA.

Dood DC, Blakely AA, Thornbury RS, Dewes HF. 1960. Muscle degeneration and yellow fat disease in foals. *N Z. Vet. J.* 8: 45-50.

Foreman JH, Potter KA, Bayly WM, Liggitt HD. 1986. Generalized steatitis associated with selenium deficiency and normal vitamin E status in a foal. *JAVMA* 189: 83-87.

Freestone JF, Carlson GP. 1991. Muscle disorders in the horses: a retrospective study. *Equine Vet. J.* 23: 86-90.

Gerloff B. 1992. Effect of selenium supplementation on dairy cattle, *J. Anim. Sci.* 70: 3934-3940.

Gill TA, Sundeen GB, Richards JF, et al. 1980. The effects of dietary selenium and vitamin E on avian white muscle disease as measured by both chemical and physical parameters. *Poult Sci.* 59: 2088-2097.

Godeau JM. 1992. Pathologies musculaires et enzymes sériques. *Ann. Méd. Vet.* 136: 211-219.

Grimminger-Heigl G. 1993. Referenzbereiche in der Labordiagnostik beim Pferd. Dissertation, Dr. TM. Ludwig Maximilian Universität München, Tierärztlichen Fakultät München, Deutschland.

Hartley WJ, Dood DC. 1957. Muscular dystrophy in New Zealand livestock. *NZ Vet J.* 5: 61-66.

Heath SE. 1995. Clinical Evaluation of Muscle and Muscular Disorders. In: *The Horses. Disease and Clinical Management. Vol.2.* Ed. By CN Kobluk and col. W.B. Saunders Co, London.

Hintz HF. 1999. Source of selenium for grazing horses. *Equine Pract.* 21: 6.

Hodson A. 1998. Enfermedades musculares, en: Colahan. P, J Moore, A. Merritt, I. Mayhew. En: *Medicina y Cirugia equina*, Ed. Intermedia, Buenos Aires, Argentina, 2 (4), PP 1276-1278.

Hoshino Y, Ichijo S, Osame S, et al. 1989. Studies on serum tocopherol, selenium levels and blood glutathione peroxidase activities in calves with white muscle disease. *Nippon Juigaku Zasshi.* 51: 741-748.

Ishii M, Ogata H, Shimizu H, Takeuchi Y, Nozawa T, Yamamoto Y, Okamoto T, Shimamura T, Utsumi A, Jitsukawa T, Endo M, Fukuda T, Yamanoi T. 2002. Effects of vitamin E and selenium administration on pregnant, heavy draft mares on placental retention time and reproductive performance and on white muscle disease in their foals. *J. Equine Vet Sci.* 22.: 213-220.

- Jubb KVF, Kennedy PC.** 1970. Pathology of Domestic Animals. 2nd ed. Vol 2. Academic Press Inc. New York.
- Jones D, Howard AN, Gresham GA.** 1969. Aetiology of “yellow fat” disease (Pansteatitis) in the wild rabbits. *J Comp Pathol.* 79: 329- 334.
- Krishnamurti CR, Ramberg CF, Shariff MA.** 1989. Kinetic modeling of selenium metabolism in nonpregnant ewes, *J. Nutr.* 119: 1146-1155.
- Kronemann J, Wensvoort P.** 1968. Muscular dystrophy and yellow fat disease in Shetland pony foals. *Neth J Vet Sci.* 1: 42-48.
- Kursa J.** 1975. Activity of some serum enzymes in calves suffering from white muscle disease. *Vet. Med. (Praha).* 20: 489-494.
- Lofstedt J.** 1997. White muscle disease of foals. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 13: 169-183.
- Lopez Alonso M, Miranda M, Hernández J, Castillo C, Benedito JL.** 1997. Glutathion peroxidasa (GSH-PX) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes, *Arch. Med. Vet.* 29 (2): 171-180.
- Maylin GA, Rubin DS, Lein DH.** 1980. Selenium and vitamin E in horses. *Cornell Vet.* 70: 272-289.
- McMurray CH, Rice DA.** 1982. Vitamin E and Selenium deficiency diseases. *Ir. Vet. J.* 36: 57-67.
- Moore RM, Kohn CW.** 1991. Nutritional muscular dystrophy in foals. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 13: 476-489.
- Munson TO, Holzworth J, Small E, Witzel S, Jones TC, Luginbuhl H.** 1958. Steatitis (“yellow fat”) in cats fed canned red tuna. *JAVMA* 133: 563-568.
- Oh S, Ganther HE, Hoekstra WG.** 1974. Selenium as a component of glutathion peroxidase isolated from ovine erithrocytes, *Biochemistry* 13: 1825-1829.
- Osame CS, Ichijo S, Takeda T, Watanabe K, Tokumoto K, Takahashi E.** 1989. Clinical and clinicopathological observations on white muscle disease in heavy breed foals. *J. Jap. Vet. Med. Ass.* 42: 615-619.
- Osame S, Ohtani T, Ichjo S.** 1990. Studies on serum tocopherol and selenium levels and blood glutathione peroxidase activities in lambs with white muscle disease. *Nippon Juigaku Zasshi.* 52: 705-710.
- Owen RR, Moore JN, Hopkins JB, Arthur D.** 1977. Dystrophic myodegeneration in adult horses. *JAVMA.* 171: 343-349.

- Pehrson B, Ortman K, Madjid N, Trafikowska U.** 1999. The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves. *Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Environment and Health, Section of Field Research, SE-532 23 Skara, Sweden.*
- Plagia DE, Valentine WN.** 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- Platt H, Whitwell KE.** 1971. Clinical and pathological observations on generalized steatitis in foals. *J Comp Pathol* 81: 499-506.
- Rioseco M.** 2001. Actividad de GSH-px en caballos criollo chilenos y su respuesta a una suplementación con selenio. *Tesis de Magíster, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.*
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG.** 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179: 588-590.
- Smith HA, Jones TC, Hunt RD.** 1972. *Veterinary Pathology.* 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger. USA.
- Stowe HD.** 1967. Serum selenium and related parameters of naturally and experimentally fed horses. *J. Nutr.* 93 (4): 60.
- Stowe HD, Herdt TH.** 1992. Clinical assessment of selenium status of livestock, *J Amin. Sci.* 70: 3928-3933.
- Surai PF.** 2003. Selenium – vitamin E interaction: does 1+1 equal more than 2?. simposio Nutritional Biotechnology in the feed and food industries Proceedings of Alltech's 19th international symposium, Lexington, Kentucky. USA. 11-14 mayo 2003 pp.59-76.
- Taylor FG, Mair TS, Brown PJ.** 1988. Generalised steatitis in a adult pony mare, *Vet. Rec.* 122: 349-351.
- Ullrey DE.** 1992. Basis for regulation of selenium supplements in animal diets. *J. Anim. Sci.* 65: 1712-1726.
- Urzúa R.** 2001. Efecto de la administración parenteral de selenato de bario sobre la actividad de Glutatión Peroxidasa eritrocítica en caballos. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

- Vitovec J, Proks C, Valvoda V.** 1975. Lipomatosis (fat necrosis) in cattle and pigs. *J comp Pathol.* 85: 53-59.
- Wensvoort P, Steenbergen-Botterweg WA.** 1975. Non- extractable lipids in the adipose tissues of horses and ponies affected with generalized steatitis. *Tijdschr Diergeneeskd.* 100: 106-112.
- Whanger PD.** 2003. Metabolic pathways of selenium in plants and animals and their nutritional significance. Symposium Nutritional Biotechnology in the feed and food industries. Proceeding of Alltech's 19th International Symposium, Lexington, Kentucky. USA. 11-14 mayo 2003.pp 51-48.
- White SL.** 1993. Fat necrosis in horses, *J. Eq. Vet. Sci.* 13 (11): 615-616.
- Wilson TM, Morrison HA, Palmer NC, Finley GG, Van Dreumel AA.** 1976. Myodegeneration and suspected selenium/vitamin E deficiency in horses, *JAVMA.* 169: 213-217.
- Wintzer ZHJ.** 1986. Equine Diseases. Verlag-Parey, Berlin.
- Witchel JJ, Grace ND, Firth EC.** 1998. The effect of injectable barium selenate on the selenium status of horses on pasture. *N Z. Vet. J.* 46: 186-190.
- Wright PL, Bell MC.** 1966. Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine, *Am. J. Physiol.* 211: 6-10.

8. ANEXOS

Anexo 1. Variación individual en la actividad de GSH-px eritrocítica en los caballos tratados con Selplex 50 durante 15 días.

Número Animal	Sexo	0 días (U/g Hb)	30 días (U/g Hb)	60 días (U/g Hb)	90 días (U/g Hb)	Estado fisiológico
luzma	H	113	38	44	57	preñada
diablura	H	126	19	31	63	preñada
pretencioso	M	104	33	46	58	
facundo	M	46	37	44	54	
leuca	H	75	133	136	17	
consentido	M	96	57	62	85	
baranda	H	98	21	27	44	preñada
Media	/	94,0	48,3	55,7	54,0	
d.e	/	26,4	39,4	37,2	20,6	

Anexo 2. Variación individual en la actividad de GSH-px eritrocítica en los caballos tratados con Selplex 50 durante 30 días.

Número Animal	Sexo	0 días (U/g Hb)	30 días (U/g Hb)	60 días (U/g Hb)	90 días (U/g Hb)
Luzm/capuc.	M	111	141	180	167
Capucha	H	92	204	240	221
Rinconera	H	99	30	12	23
Estaquilla	H	61	17	135	9
Diabl/desp	M	22	14	144	3
Duela	H	117	40	195	158
Doblá	H	110	158	193	211
Media	/	87,4	86,3	157,0	113,1
d.e	/	34,3	78,9	72,8	97,7

Anexo 3. . Variación individual en la actividad de GSH-px eritrocítica en los caballos del grupo control.

Número Animal	Sexo	0 días (U/g Hb)	30 días (U/g Hb)	60 días (U/g Hb)	90 días (U/g Hb)
chicotera	H	89	91	112	120
caleuche	M	117	103	128	123
dobloná	H	111	92	109	119
lucero	M	129	120	123	121
estrellero	M	110	122	97	110
respingona	H	61	68	86	80
flor	H	107	104	115	123
Media	/	103,4	100,0	110,0	113,7
d.e	/	22,2	18,6	14,5	15,5

9. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por el constante apoyo que me dieron durante este largo proceso.

Al Dr. Oscar Araya V. por el tiempo entregado.

Al Dr. y amigo Hedi Bustamante que sin su gran ayuda el término de este trabajo hubiese sido mucho más difícil.

A Don Alfredo Keim por sus constantes incentivos.