

Respuesta de Ratas SD a la administración de ciclofosfamida y bleomicina mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*1}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2}.**

*Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Aspirante a Investigador.

**Licenciado en Microbiología, Profesor Instructor.

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

²Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Teléfono: 057(07)2716911.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

En este estudio decidimos evaluar y comparar la respuesta de ratas SD de ambos sexos a la administración de dos sustancias mutagénicas mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. Para lo cual se formaron 5 grupos experimentales/sexo, el primero administrado con NaCl al 0,9% por vía intraperitoneal (i.p), el segundo y el tercero administrados con ciclofosfamida por vía i.p, con diseños de tratamientos diferentes en dosis de 50 mg/kg. El cuarto y quinto grupo fueron administrados con bleomicina por vía i.p, igualmente en dos diseños de tratamientos diferentes en dosis de 40 mg/kg. Al final de la experiencia se obtuvieron mayores resultados de inducciones de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales con el uso de la ciclofosfamida y la bleomicina, administradas 48 y 24 horas antes del sacrificio en ratas SD de ambos sexos. Lo cual constituye el mejor diseño experimental para inducir un número considerable de aberraciones cromosómicas. No obstante se evidenció alta sensibilidad de esta línea de rata en ambos sexos a la acción de ambos mutágenos independientemente del esquema de tratamiento utilizado.

Palabras clave: Ensayo de aberraciones cromosómicas, ratas Sprague Dawley, ciclofosfamida, bleomicina.

Abstract

SD rats response to the cyclophosphamide and bleomycin administration by means of the chromosomal aberration assay in bone marrow.

In this study we decided to evaluate and compare the SD rats response of both sexes in the administration of two mutagenic substances by chromosomal aberrations assay in bone marrow cells. Which were formed 5 experimental groups per sex, the first administered with NaCl 0,9 % by intraperitoneal (i.p) route, the second and third groups were administered with cyclophosphamide by i.p route, with designs of different treatments at doses of 50 mg/kg. The fourth and fifth groups were administered with bleomycin by i.p route, equally in two designs of different treatments at doses of 40 mg/kg. At the end of the experience obtained higher results of inductions of numeric and structural chromosome aberrations with the use of cyclophosphamide and bleomycin were administered 48 and 24 hours before sacrifice in SD rats of both sexes. This constitutes the best experimental design to induce a considerable number of chromosomal aberrations. Nevertheless high sensibility of this rat line in both sexes was evidenced to the action of both mutagens independently of the outline of used treatment.

Key words: Chromosomal aberration assay, Sprague Dawley rats, cyclophosphamide, bleomycin.

Introducción

El ensayo citogenético *in vivo* es un ensayo de mutagenicidad a corto plazo, de gran sensibilidad, útil para detectar fundamentalmente aberraciones cromosómicas estructurales.^{1, 2}

Con los mutágenos químicos, la mayor parte de las aberraciones inducidas son de tipo cromatídico. En este método, se utilizan células de médula ósea de mamíferos expuestos, por vías apropiadas, a las sustancias de ensayo y sacrificados a intervalos sucesivos. El tejido diana es la médula ósea por estar más vascularizado y por contener una población de células de ciclo muy corto las cuales pueden aislarse y tratarse con facilidad. En el presente método no se consideran otras especies ni otros tejidos diana.³

Antes de sacrificarlos, se trata a los animales por medio de sustancias como la colchicina, que actúan como inhibidores del huso, con el fin de acumular las células en una fase de mitosis del tipo metafásico (c-metafase). A partir de las células se efectúan preparaciones de cromosomas secadas al aire y, después, teñidas; a continuación se analizan las metafases en el microscopio para observar las aberraciones cromosómicas.⁴

En las sustancias declaradas como genotóxicas deben producirse aberraciones estructurales *in vivo* con grados de exposición en los que quepa esperar un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Las dosis utilizadas deben ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados.^{3, 4}

Por lo general en los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias mutagénicas conocidas, dentro de las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL),¹⁻⁴ la primera constituye un agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos;⁵ y la segunda induce labilidad y ruptura de la estructura del ADN; al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres.^{6,7} Se une al ADN a través de su péptido amino terminal y el complejo activado genera radicales libres que se encargan de la ruptura.⁶ La bleomicina se activa por el citocromo P-450 ejerciendo acciones enzimáticas oxidativas, lo cual trae consigo la aparición de aberraciones sobre todo rupturas de cromátides, huecos, fragmentos y translocaciones.^{6, 7}

No obstante hemos de destacar que ambas drogas son utilizadas como antineoplásicas. La ciclofosfamida pertenece al grupo cloro-etilaminas. El desarrollo de éste agente representó un esfuerzo para lograr mayor selectividad de la droga hacia el tejido tumoral. Considerado un agente alquilante bifuncional, no posee especificidad por fase alguna del ciclo celular.⁸ En tanto la bleomicina es considerada dentro del grupo de los antibióticos tumorales.^{6, 7} La principal vía de aplicación es la endovenosa, mientras que la subcutánea, intramuscular e intraperitoneal constituyen alternativas secundarias. No se administra por vía oral debido a la deficiente absorción e inactivación intestinal y hepática.⁸ Una particularidad en la cinética de la bleomicina y que probablemente influye en los mecanismos de resistencia a la misma, es la biotransformación que experimenta en la mayoría de los tejidos por la enzima bleomicina-hidrolasa, excepto en piel, pulmón y en ciertas neoplasias. Las células tumorales son más susceptibles a la bleomicina durante la proliferación activa y son demoradas específicamente en su progresión a través de la fase G del ciclo celular.⁸

Existe gran polémica sobre los diferentes tipos de esquemas de tratamiento en los cuales se utilizan las sustancias mutagénicas como controles positivos en los ensayos de mutagénesis y/o genotoxicidad. Así como diversas dosis han sido utilizadas, pero por lo general todo versa en el uso del biomodelo animal ideal respondedor a la acción de la sustancia mutagénica utilizada.

Por lo cual en este artículo decidimos evaluar en ratas SD de ambos sexos, la respuesta a ciclofosfamida y a bleomicina, administradas por vía intraperitoneal (i.p), diferenciado la respuesta a ambos mutágenos cuando son administrados 48 y 24 horas antes del sacrificio y cuando es administrado 24 antes del mismo, en el ensayo de aberraciones cromosómica en células de la médula ósea.

Materiales y métodos

- Animales.

Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultos jóvenes de ambos sexos (6-8 semanas), su peso corporal oscilaba entre 180-210 g al término de la cuarentena. Se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue ad libitum. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio de la República de Cuba.

- Administración y dosificación.

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 a.m, y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (5 ratas/grupo/sexo), en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 10 ratas/grupo/sexo/.

En el grupo experimental 1 se utilizó como control negativo el cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%, adquirido de la firma BDH (BDC), con un 99% de pureza. Administrado por vía i.p, en dosis de 2 mL/kg en dos ocasiones con intervalos de 24 horas entre ambas administraciones.

En los grupos experimentales 2 y 3 se utilizó la CF, adquirida de la firma comercial mexicana Lemri S.A bajo la marca LEDOXINA. Administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 2 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 3. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 50 mg/kg,⁹ por vía i.p, el cual se disolvió en disolución salina (NaCl) al 0,9 % administrado a razón de 10 mL/kg.¹⁰

En los grupos experimentales 4 y 5 se utilizó la BL, adquirida de los Laboratorios PISA, S.A. de C.V. México, bajo el nombre BLOMINDEX (polvo). Administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 4 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 5. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 40 mg/kg, dosis algo menor a la utilizado en ratones por ser las ratas más susceptibles a este

mutágeno, ¹¹ por vía i.p, el cual se disolvió en disolución salina (NaCl) al 0,9 % administrado a razón de 10 mL/kg.

- Observaciones clínicas.

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

- Sacrificio.

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical con previa atmósfera de éter, en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 4 el sacrificio fue 24 h después de la segunda administración de cada sustancia, en el caso de los grupos experimentales 3 y 5 el sacrificio se realizó 24 horas posteriores a la única administración del mutágeno.

- Ensayo de aberraciones cromosómicas in vivo.

En el horario de la mañana (2 horas antes del sacrificio), ^{9,12} la división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (6 mg/kg, vía i.p). Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó con 3 mL de suero bovino fetal (SBF). La suspensión celular se centrifugó, eliminándose el sobrenadante. Después de un tratamiento hipotónico de las células del botón con KCL (0,075 M), se realizó una segunda centrifugación. El botón celular se fijó en una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 15 minutos. Se realizaron 3 fijaciones con centrifugaciones sucesivas, y se extendieron en láminas húmedas con enfriamiento previo. Las láminas se secaron al aire y se tiñeron con solución de Giemsa al 10 % durante 25-30 min.¹² Se contabilizaron 100 metafases por animal con el uso de un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión). Se determinó el número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos. También se calculó el índice mitótico IM % (porcentaje de metafases en 1 000 células leíbles) y el número de células con poliploidía en 1 000 células leíbles, todas las determinaciones fueron leídas por dos observadores, para luego establecer un promedio entre ambas.¹²

- **Análisis estadístico.**

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza en la variable continua índice mitótico, los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existiendo dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (test de Levene). Por lo cual se analizó con el uso de esta prueba, siendo el nivel de significación establecido de $\alpha = 0.05$. Las variables categóricas, número de células con aberraciones, frecuencia de gaps y de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos, así como el número de células con poliploidía,¹² se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado, el nivel de significación establecido fue de $\alpha = 0.01$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados y discusión

En ninguna de las dos réplicas experimentales realizadas tanto en los grupos control negativo como en los grupos tratados con ciclofosfamida en sus diferentes diseños se encontraron animales con signos clínicos indicativos de toxicidad.

Según los resultados obtenidos por nosotros en este estudio de inducción de aberraciones cromosómicas utilizando dos tipos de mutágenos; podemos observar que independientemente del tipo y tratamiento utilizado difieren significativamente en ambos sexos con el grupo control negativo. Esto nos permitió corroborar los resultados obtenidos de forma inducida en nuestra investigación, dando mayor veracidad a nuestro ensayo.

En primer lugar se aprecian los resultados pertenecientes al índice mitótico (%) y el número de células con poliploidía. En ambos sexos la CF y la BL administradas 48 y 24 horas antes del sacrificio difieren significativamente con los demás grupos. Obteniéndose resultados con el uso de la CF de $3,62 \pm 0,10$ en los machos y de $3,44 \pm 0,28$ en las hembras y para el caso de la BL de $3,70 \pm 0,11$ en los machos y $3,52 \pm 0,19$ en las hembras. Al comparar los resultados entre ambos tratamientos se observan que no difieren, los resultados obtenidos con la CF son consistentes con los obtenidos por nosotros utilizando esta misma línea de ratas a la misma dosis y tratamiento.⁹ Además se aprecia que las hembras responden mejor a ambos mutágenos en este tipo de tratamiento que los machos, son más susceptibles.

Los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan en su totalidad con estudios anteriores en ratones Balb-C; donde se observó que solo el grupo de CF administrado 48 y 24 horas antes del sacrificio difirió de forma significativa con los demás grupos. Esto presupone que las ratas son más susceptibles a la BL que los ratones¹³ o que en estas la BL es metabolizada con mayor efectividad que en los ratones llegando al sitio diana analizado mayor cantidad de principio activo. Esto permite que se manifieste mayor daño hasta llegar a ser relativamente igual al de la CF, independientemente de la diferencia existente entre los mecanismos de acción genotóxica por los cuales operan ambos mutágenos.^{5, 8, 14-17}

En un segundo lugar se observan los resultados pertenecientes a las aberraciones cromosómicas de tipo estructural, principalmente aquellas aberraciones que este tipo de ensayo es capaz de detectar con alta especificidad. Dentro de éstas se destacan un alto

número en ambos mutágenos de aberraciones de tipo cromatídica dado por rupturas, tal y como está descrito por estos dos mutágenos.^{9, 10, 13}

Igualmente a las variables anteriormente analizadas la CF y la BL administradas a las 48 y 24 horas antes del sacrificio difirieron de forma significativa con respecto al otro esquema de tratamiento de estos mismos mutágenos en las aberraciones de tipo estructural. Se observan valores del número total de células con aberraciones en el caso de la CF que van desde 218 en los machos hasta 245 en las hembras, para el caso de la BL van desde 207 para los machos hasta 231 en las hembras. Por otra parte no se observó diferencias significativas entre ambos tratamientos. Los resultados obtenidos con el uso de la CF, 48 y 24 horas antes del sacrificio coinciden con los obtenidos por nosotros con el uso de esta línea de ratas a la dosis, vía y tratamiento realizado.⁹

Pensamos que las diferencias significativas encontradas entre los diferentes tratamientos de CF están dadas por la velocidad y farmacocinética de este promutágeno. Para manifestar su efecto genotóxico es necesario que esta droga sea metabolizada por el hígado al menos por las enzimas de fase I y de fase II, ya que el tiempo constituye un factor importante y determinante del potencial mutagénico y genotóxico de este clastógeno químico.⁸

En los animales tratados con la BL también se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de tratamientos. Pero en este caso la BL si constituye un verdadero mutágeno y que tal y como se administra es capaz de ejercer su efecto mutagénico a altas dosis al ser metabolizada por el hígado en poco tiempo.⁸ La diferencia estuvo dada por mayor biodisponibilidad del mutágeno en las células dianas obtenidas y analizadas en este estudio, al ser administrada la BL en dos ocasiones. Además de ser las ratas más susceptibles a la BL que los ratones Balb-C, donde en un estudio realizado con esta línea de ratones no se observaron diferencias entre ambos tipos de tratamientos.¹³ La diferencia puede estar dada por mayor susceptibilidad genética y especie dependiente con el uso de este mutágeno.

Por otro lado este estudio permitió afirmar que en el caso de utilizar las ratas SD en ambos sexos como biomodelo en este ensayo podemos inducir eficientemente aberraciones cromosómicas tanto de tipo numérica como estructural utilizando la CF o la BL. Por supuesto

administradas en dos ocasiones 48 y 24 horas antes del sacrificio programado por vía i.p y aplicadas en las dosis antes descritas.

Conclusiones

Al final de la experiencia se obtuvieron mayores resultados de inducción de aberraciones cromosómicas con el uso de la ciclofosfamida y la bleomicina, administradas 48 y 24 horas antes del sacrificio en ratas SD de ambos sexos. Lo cual constituye el mejor diseño experimental para inducir un número considerable de aberraciones cromosómicas. No obstante se evidenció una alta sensibilidad de esta línea de rata en ambos sexos a la acción de ambos mutágenos independientemente del esquema de tratamiento utilizado.

Resultados de la frecuencia inducida con ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratas SD de ambos sexos.

Grupos	IM (%) ^a	Células con Poliploidia ^b	Gaps ^b	Aberraciones/1 000 células/grupo ^b				# de Células con aberraciones ^b
				Cromosómicas		Cromatídicas		
				Rupturas	Intercambios	Rupturas	Intercambios	
Machos								
CN	5,21 ± 0,25	3	6	0	0	11	6	17
CF1	3,62 ± 0,10aAc	25aAc	65aAc	12aAc	21aAc	147aAc	38aAc	218aAc
CF2	4,21 ± 0,13bc	17bc	38bc	5bc	7bc	100bc	10bc	122bc
BL1	3,70 ± 0,11aAc	23aAc	59aAc	11aAc	19aAc	143aAc	34aAc	207aAc
BL2	4,32 ± 0,2bc	13bc	33bc	3bc	8bc	94bc	10bc	115bc
Hembras								
CN	5,05 ± 0,14	3	7	0	0	10	9	19
CF1	3,44 ± 0,28aAc	30aAc	70aAc	13aAc	23aAc	166aAc	43aAc	245aAc
CF2	4,36 ± 0,17bc	19bc	46bc	6bc	9bc	125bc	14bc	154bc
BL1	3,52 ± 0,19aAc	27aAc	63aAc	10aAc	21aAc	161aAc	39aAc	231aAc
BL2	4,43 ± 0,06bc	14bc	40bc	4bc	7bc	119bc	12bc	142bc

^aX ± D.E. De un total de 10 000 células/grupo/réplica para un total de 20 000 células evaluadas. Diferencias significativas (^a p<0.05; ANOVA) y (^b p<0.01; prueba no paramétrica χ^2 , 100 células/animal). IM=Índice mitótico. Letras diferentes (a y b) difieren al comparar los resultados entre mutágenos para el mismo sexo.

(A) Resultados que difieren al comparar los diferentes tratamientos utilizando el mismo mutágeno para el mismo sexo.

(c) difieren al comparar los resultados contra el control negativo (CN).

CF1=Ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio. CF2=Ciclofosfamida administrada 24 horas antes del sacrificio. BL1=Bleomicina administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio. BL2=Bleomicina administrada 24 horas antes del sacrificio

Referencias bibliográficas

1. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res* 1999; 189:157-165.
2. Sorsa M, Ojajärvi A, Salomaa S. Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic: chemicals. *Teratogen, Carcinogen, and Mutagen* 1999; 10:215-221.
3. Richold M, Chandly A, Ashby J, Catehouse DG, Bootman J. *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests*. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney; 1990.p.115-141.
4. Tice RR, Hayashi M, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH. Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res* 1994; 312:305-312.
5. Te C, Gentile JM, Baguley BC, Pearson AE. *In vivo* effects of chlorophyllin on antitumour agent cyclophosphamide. *Int J Cancer* 1997; 70(1):84-9.
6. Sanchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez AJ, Davison GP, León OS. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPAinduced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* 2000; 42:565-573.
7. Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez AJ. Effect of *Mangifera indica* L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res* 2001; 15:581-585.
8. Prieto G, Errecalde C, Trotti N. *Farmacología clínica de los antineoplásicos*. *Monog Med Vet* 1999; 19(2):1-8.
9. Arencibia DF, Rosario LA. Evaluación de ratas *Sprague Dawley* como biomodelos experimentales en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Rev Arg Vet* 2010; 27:264.
10. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, López Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos. *Retel* 2009; 23(2):8-22.

11. Díaz S, González I, González R, Coll F. Evaluación antigenotóxica *in vivo* de un análogo de brasinosteroides. Rev Cub Farm 2008; 42(Sup Esp 3):75-76.
12. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. Retel 2009; 25(3):22-38.
13. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco DL. Comparación de la respuesta de ratones Balb-C frente a dos sustancias mutagénicas mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas. Rev Arg Vet 2010; 27:264.
14. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossío M, Prieto E. VIMANG: los efectos antigenotóxicos y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. Rev Cubana Invest Biomed 2001; 20(1):48-53.
15. Hartman A, Herkommer K, Glück M, Speit G. DNA-Damaging effects of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet Assay). Environ Mol Mutagen 1995; 25:180-187.
16. Mani S, Buzaid AC, Cadman EC. Pharmacology of antineoplastic agents, multidrug resistance, and the feature. En: Hoffman R, et al eds. Hematology: basic principles and practice. 2 ed. New York: Churchill Livingstone; 1995.p.915-940.
17. Alvarez C, Rodríguez R, Wong P, Arévalo J, Canga M, Torres R, Chang L. Nueva Alternativa en el Manejo del Craneofaringioma Sólido Quístico: Bleomicina Intracavitaria más Resección Neuroendoscópica. Anal Facult Med 1999; 60(4):293-297.

Recibido: 01/03/10

Aceptado: 22/03/10