

Trabajo Original

Toxicología Experimental

La infusión de hojas de planta de higo (*Ficus carica*) y su acción sobre melanoforos de pez cebra (*Danio rerio*) bajo irradiación y monitoreo cardíaco "In vivo"

Marco Álvarez¹, Sonia M. Alvarado-Rico², José M. Ercolino³, Lourdes Perdomo¹

¹Laboratorio de Microscopia. Instituto Anatómico "José Izquierdo". Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Autor de Correspondencia. Telf: 0212-6053439.Fax: 0212-6053449. <http://www.med.ucv.ve/IA/SecMicElec.htm>

²Catedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay Estado Aragua. Venezuela Apartado 2101.

³Laboratorio de Morfologías Integradas. Instituto Anatómico "José Izquierdo" Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Resumen

El efecto de una infusión de hojas de planta de Higo (*F. carica*), fue evaluado sobre células pigmentadas de larvas de pez cebra (*Danio rerio*), irradiadas con una fuente de diodo emisor de luz roja (LED) y con actividad cardiaca monitoreada a través del Videocardiograma. Larvas de 72 hpf fueron inmovilizadas sobre un portaobjeto cóncavo con una solución 2% de agarosa y observadas bajo un microscopio invertido OLYMPUS IX71. Los melanosomas de la porción dorso-lateral fueron focalizados a un aumento de 40x y la preparación fue sometida a un primer ciclo de irradiación en ausencia de la infusión, durante 5, 10 y 15 min. Un segundo ciclo de irradiación fue aplicado luego que las larvas inmovilizadas fueron incubadas durante 1h con $C_{1:10}$ de infusión, obtenida a partir de 30 g de hojas / 250 mL. Registros fotográficos y videos, antes y después de los respectivos tratamientos, fueron obtenidos con una cámara digital OLYMPUS DP71. El análisis de imágenes con ImageJ y el análisis de los videos con MatLab, permitió determinar los valores de área celular media, de los melanosomas y la frecuencia cardiaca de las larvas. El efecto del Azul de Metileno fue también analizado. El análisis morfométrico, determino que, en ausencia de la infusión, el tamaño y el área celular media de los melanosomas se mantuvo constante con valores alrededor de $51,19 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$. La frecuencia cardiaca se mantuvo con valores de $146,1 \pm 1,96$ pulsaciones/minuto. Sin embargo, luego del tratamiento con la infusión y finalizado el segundo ciclo de irradiación, se produjo una reducción del tamaño celular y un incremento de las proyecciones citoplasmáticas, lo cual se tradujo en un incremento del área celular media de los melanosomas con valores de $83,33 \pm 9,8 \mu\text{m}^2$, traducido en un 62% de incremento en el área celular media de estas células. La frecuencia cardiaca promedio se redujo en un 24% menos de pulsaciones/minuto. La irradiación en presencia de Azul de Metileno indujo similares cambios morfológicos no así cambios funcionales. La actividad cardiaca se mantuvo constante. La incubación del modelo larvario de pez cebra con infusión de hojas de planta de Higo (*F. carica*), sometidos a irradiación, induce cambios morfo-funcionales con señales de fotodaño a nivel de la citoarquitectura de las células pigmentadas con reducción de la frecuencia cardiaca. Probablemente la química presente en la infusión, particularmente las furocumarinas, podría ser las responsable de los daños celular observados.

Palabras claves: Infusión de Hojas de Higo, *Ficus carica*, Pez cebra, *Danio rerio*, Irradiación Luz Roja, LED, Melanosomas, Citoesqueleto, Videocardiograma.

Abstract

***Ficus carica* leaves infusion and their action on Zebrafish (*Danio rerio*) melanophores under irradiation and cardiac monitoring "In vivo".**

The effect of an infusion of plant leaves Higo (*F.carica*) was evaluated on pigmented cells of Zebrafish larvae, irradiated with a source of red light emitting diode (LED). Heart activity was followed by a Videocardiograma. 72 hpf larvae were immobilized on a concave slide with 2% Agarose solution and observed under an inverted microscope Olympus IX71. The melanophores of the dorso-lateral portion were targeted to a 40x magnification and the preparation was subjected to a first cycle of irradiation in the absence of infusion, for 5, 10 and 15 min. A second cycle of irradiation was applied after immobilized larvae were incubated for 1 h with C_{1:10} infusions from 30 g of leaves / 250mL. Photographs and videos, before and after the respective treatments, were obtained with a digital camera OLYMPUS DP71. The image analysis with ImageJ and analysis of the videos with Matlab, allowed determining the values of average cell surface melanophores and heart rate. The effect of Methylen Blue was also analyzed. Morphometric analysis, determined that, absent the infusion, the average cell area melanophores remained constant with values around $51.19 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$. Heart rate was maintained with values of 146.1 ± 1.96 beats / minute. However, after treatment with the infusion and irradiation cycle ended, there was an increase in cytoplasm projections, which resulted in an increase in average cell area values melanophores with $83.33 \pm 9.8 \mu\text{m}^2$ translated into a 62% increase in mean cell area of these cells. Heart rate was reduced by 24% fewer beats / minute. Irradiation in the presence of Methylen Blue induced similar morphological changes and no functional changes. The cardiac activity remained constant. The incubation of larval Zebrafish with *F.carica* infused, subjected to irradiation, induces morphological changes with signs of photo damage in the cytoskeleton of pigmented cells with reduction of heart rate. Probably the chemical present in the infusion, particularly the Furocoumarins, could be responsible for the observed cell damage.

Key words: *Ficus carica* infusion, Zebrafish, Melanophores, Irradiation Red Light, LED, Cytoskeleton, Videocardiogram.

Introducción

La planta de Higo ó *Ficus carica* (*F.carica*), ha sido de uso común en la medicina popular debido a sus propiedades farmacológicas ⁽¹⁾, particularmente, por su efecto anti-hipertensivo y antineoplásico ^(2,3). Entre sus principios activos, se han descrito compuestos como el psoraleno y el bergapteno ⁽⁴⁾; furocumarinas éstas que al ser excitadas pueden reaccionar por medio de radicales libres, intercalándose al ADN ó a través de la activación de la porción de furanos inducida por la UV, dando lugar a trastornos por fotosensibilidad. Cabe destacar que dicho efecto ha sido el principio de modelos biomédicos, particularmente en la denominada terapia fotodinámica (TFD) del cáncer ⁽⁵⁾, en donde el mecanismo de fotodaño y muerte a la célula neoplásica ha sido el fin principal a lograr. El pez cebra (*Danio rerio*), como modelo para el estudio de cáncer ha sido propuesto ⁽⁶⁾, así como sus características de modelo vertebrado para la investigación de toxicidad química ha sido revisado ⁽⁷⁾. Su fotosensibilidad, a través de cambios de color y efectos foto biológicos sobre células cromatóforas en cepas mutantes en estadios larvarios y adulto, también han sido reportada ⁽⁸⁾. Estas células cromatóforas, de color pardo o negro oscuro debido al contenido de melanina, conducen un patrón de pigmentación que se expresan a lo largo del tubo dorso-neural y se dispersan a lo largo del embrión vertebrado durante el desarrollo ⁽⁹⁾. Si una infusión de hojas de la planta de *F.carica*, con sus componentes característicos, induce respuestas de daño sobre células melanoforas en modelo experimental de pez cebra luego de ser irradiadas, hasta donde conocemos no ha sido claramente establecido. En tal sentido, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto fototóxico de la infusión de hojas de la planta de Higo (*F. carica*) sobre los melanoforos, "in vivo", de pez cebra (*Danio rerio*), en estadio larvario, bajo irradiación con Luz roja y monitoreo cardíaco.

Materiales y Métodos.

Infusión de hojas de Planta de Higo, *F.carica*.

Las hojas de *F.carica*, fueron obtenidas de plantas provenientes de la Urbanización San Jacinto, en el Municipio Girardot, Maracay, estado Aragua-Venezuela. Treinta gramos (30 g) de hojas frescas fueron colocados en 250 mL de agua hervida durante 5 min. Diluciones seriadas fueron realizadas, de las cuales la correspondiente a 1:10 (C_{1:10}), fue aplicada en un volumen de 20 µl / Larva. El tratamiento fue realizado a temperatura ambiente durante una hora (1h). El uso de la concentración reportada se fundamentó en información dada por individuos de la misma población, con prolongado consumo medicamentoso de la infusión de *F.carica*.

Larvas de pez cebra (*Danio rerio*).

Larvas de *Danio rerio*, provenientes de peces de cepas silvestres cultivados en nuestro laboratorio, fueron seleccionadas de acuerdo al estadio de horas post-fertilización (hpf) ⁽¹⁰⁾, en edad de 72 horas. Una vez seleccionadas las larvas, las mismas fueron colocadas en lámina portaobjetos cóncavos e inmovilizados de manera parcial, en una matriz de Agarosa de bajo punto de fusión, Sigma Ha-9915, preparada al 2%, en solución fisiológica Tyrodes. La viabilidad de las larvas, seguida la inmovilización y previo a la aplicación de los respectivos ciclos de tratamientos: 1) Irradiación (-) infusión y 2) irradiación (+) 1h de infusión, fue seguida a través del monitoreo cardiaco. Para ello se determino el patrón de contracción cardiaca sobre la estructura tubular del corazón de larva, antes y después de los respectivos tratamientos, haciendo uso del sistema de Videocardiograma desarrollado en nuestro laboratorio ⁽¹¹⁾.

Ciclos de Irradiación (LED).

La irradiación fue realizada con el uso de una fuente de diodo emisor de Luz de alta intensidad de Luz visible roja, (LED), modelo TLHK5100, marca Vishay, de longitud de onda (λ), de 640 ± 20 nm y una intensidad de 4 mW/cm^2 , colocado a un centímetro (1 cm) de distancia de la muestra. Un primer ciclo de irradiación fue realizado en ausencia de la infusión (Irradiación (-) infusión), considerado como la condición control. Para ello, sobre las larvas inmovilizadas y con monitoreo cardiaco, se ubicaron las células pigmentadas o melanoforos de la porción ventro-lateral de las larvas de pez cebra. Una vez identificadas las células, fue realizado un primer registro fotográfico de las características morfológicas de la población celular seleccionada y de inmediato fue activada la fuente de luz, para hacer los registros fotográficos a los 5, 10 y 15 min, durante un primer ciclo de irradiación, en ausencia de la infusión. Un segundo ciclo de irradiación fue realizado en presencia de la infusión (Irradiación (+) infusión). Luego de 1h de tratamiento, con las células en igual posición, fue activada la fuente de irradiación y de igual manera, durante 5, 10 y 15 min, fueron realizados los respectivos registros fotográficos El registro de la actividad cardiaca fue realizado pre y post-tratamiento. Los ciclos de irradiación fueron ensayados en presencia de Azul de Metileno, un conocido compuesto de Tiazina, vinculada con daño fototóxico a nivel de los microtubulos (MTs). Este tipo de compuestos inducen una disrupción de los usos mitóticos generando una detección del ciclo celular. Como consecuencia del bloqueo mitótico, las células se conducen a un proceso de muerte celular denominado catástrofe mitótica ⁽¹²⁾

Análisis morfométrico.

Los registros fotográficos, correspondientes a imágenes digitales en formato TIFF, fueron procesados en *Adobe Photoshop CS3*, Versión 10.1, a través de la colocación en

modo escala de grises y ajustadas con contraste automático. Imágenes ajustadas a 8-bit, 1,3 MB, fueron analizadas en una plataforma ImageJ, Versión 1.36, a través del complemento tridimensional 3D, resaltando el área celular, entre otros parámetros, calculados antes y después de los respectivos tratamientos. Las diferencias morfológicas fueron realizadas en el programa Microsoft Office Excel 2003. Valores medio, desviaciones estándar y pruebas de comparación de medias, fueron aplicados ($X \pm DE$).

Resultados

La expresión morfológica de los melanoforos, de la porción ventro-lateral de las larvas de pez cebra, se mantuvo constante una vez finalizado el primer ciclo de irradiación. Se observaron células con un cuerpo celular uniforme, de reducido número de proyecciones citoplasmáticas, con un área celular media (acm), de valores alrededor de $51,19 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, finalizado el segundo ciclo de irradiación, en presencia de la infusión, la expresión morfológica de los melanoforos se observó modificada, con células transformadas, caracterizadas por menor tamaño de cuerpo celular, pero con una mayor presencia de proyecciones citoplasmáticas. La mayor presencia de proyecciones citoplasmáticas se tradujo en un incremento de en el acm, con valores de alrededor de $83,33 \pm 9.8 \mu\text{m}^2$, con un incremento de 62% de esta. Los cambios observados se ejemplifican a través de una secuencia de imágenes de una larva inmovilizada en posición ventro-lateral (Fig.1). Se destaca el estado inicial de la larva, al tiempo de 5', 10' y 15' de irradiación, en ausencia de la infusión (control +IR), así como los melanoforos irradiados luego de una hora de incubación con la infusión (1h F.c + IR 15'). Trascurrido el primer ciclo de irradiación, en ausencia de la infusión, no se observan cambios significativos en el cuerpo y la forma celular. Dichos parámetros presentan una tendencia a permanecer constante. Sin embargo, a partir del segundo ciclo de irradiación, en presencia de la infusión, la secuencia de cambios morfológicos ilustra la reducción del cuerpo celular de los melanoforos (*), a través de modificaciones de la densitometría en color rojo. La misma se presenta en menor proporción, a medida que avanza el tiempo de tratamiento de irradiación (T5', T10' y T15'). Concomitantemente se destacan las numerosas proyecciones citoplasmáticas (flechas), las cuales se incrementan respecto a la condición inicial, a medida que se incrementa el tiempo de irradiación. Con los ciclos de irradiación en presencia de Azul de Metileno se indujeron cambios morfológicos similares, igualmente vinculados con una reducción en el cuerpo celular e incremento del área celular media de los melanoforos con la generación de proyecciones citoplasmáticas (Fig.2). El estado funcional de la larva de pez cebra, antes y después de 1h de incubación con la infusión + los 15' de irradiación, fue expresado a través del monitoreo cardíaco, con registro de la frecuencia cardíaca en pulsaciones por minuto (P/min). La frecuencia cardíaca se mantuvo constante, una vez

finalizado el primer ciclo de irradiación. Sin embargo, finalizado el segundo ciclo de irradiación, en presencia de la infusión, con 1h de tratamiento, los valores de frecuencia cardiaca presentaron una reducción estimada en un 24% de disminución de las pulsaciones/ minuto (P/min). El registro gráfico del VCG (Fig.3), muestra la evolución de los puntos máximos de luminosidad, como una secuencia regular y homogénea de intervalos, en función del tiempo t(s), interpretando el valor de frecuencia cardiaca promedio (Avg Freq), antes del tratamiento (Fig.3A). Particularmente, se muestran valores de Avg Freq, alrededor $146,1 \pm 1,96$ P/min. En contraste, luego del tratamiento (Fig.3B), se presentó un registro irregular y poco homogéneo, con saltos arrítmicos, que se tradujo en una reducción en el valor de los intervalos máximos de luminosidad en función del tiempo, registrándose valores alrededor de $112,2 \pm 3,2$ P/min. La actividad cardiaca, en presencia de AM se mantuvo constante durante los dos ciclos de irradiación. Los cambios registrados, tanto morfológicos como funcionales corresponden a una población embrionaria evaluada de 30 larvas (N=30).

Discusión.

Los resultados indican que la infusión de *F.carica*, aplicada "in vivo", sobre melanoforos de pez cebrá sometidos a ciclos cortos de irradiación con luz visible roja, promueve un efecto fototóxico a nivel del citoarquitectura de los melanoforos. El efecto descrito sobre estas células epidérmicas podría ser la consecuencia de foto-reacciones directas sobre organelos subcelulares específicos ⁽¹³⁾, ó sobre biomoléculas estructurales del citoesqueleto; a mencionar; microtubulos (MTs), microfilamentos (MFs) y microfilamentos intermedios (MFi) ⁽¹⁴⁾. Foto-reacciones estas que estarían vinculadas, probablemente, con la presencia de compuestos foto-activos capaces de generar señales de stress fotodinámico que tendría al citoesqueleto como un blanco en la célula tratada. La información arrojada del ensayo con Azul de Metileno, nos orienta a pensar en esta última posibilidad, sugiriendo que la infusión de *F.carica* utilizada, estaría entonces promoviendo un efecto fototóxico mediado por la alteración en los microtubulos del citoesqueleto. Cabe destacar, que dichos componentes organizan el citoplasma celular garantizando el desarrollo y mantenimiento del estado e integridad de las células. Por consiguiente, los componentes del citoesqueleto se constituyen en objetivo clave en el consumo indiscriminado de infusiones de *F.carica*, debido probablemente a su constitución química. Cabe destacar que el citoesqueleto, como blanco en TFD, ha sido vinculado con distintos procesos de muerte celular. Es el caso de la catástrofe mitótica promovida por la aplicación de compuestos como los Porfisenos (TPPo) y sus derivados (PdTPPo) ⁽¹⁵⁾. Extractos de psoralen han sido evaluados sobre melanoforos de peces "in vitro" ⁽¹⁶⁾. Dosis sub-letales de TPPo, inducen una disrupción del huso mitótico, sobre

keratiocitos de ratón en cultivo (Pam-212), generando una detención del ciclo celular. Como consecuencia del bloqueo mitótico, las células finalizaron en un proceso de muerte celular denominado catástrofe mitótica ⁽¹⁷⁾. También, la apoptosis ha sido reportada en células HeLa, después del tratamiento con PdTPPo. La mayoría de los núcleos de las células irradiadas, se muestran con la típicas condensación y fragmentación de la cromatina luego de 24h después del tratamiento ⁽¹⁸⁾. Resulta evidente pensar que las modificaciones en la citoarquitectura de los melanoforos, expuestas en la presente investigación, estarían conduciendo a estas células hacia algunas de las formas conocidas de muerte celular.; apoptosis, catástrofe mitótica, entre otros. Por otra parte, no debemos olvidar la vinculación del efecto fototóxico con un efecto sistémico sugerido por la caída de frecuencia cardiaca observada. Probablemente debido a la aplicación generalizada y no tópica de la infusión. Todos los resultados expuestos contribuyen, por tanto, con una evidencia "in vivo", de modelo experimental de terapia fotodinamica, que vincula el foto-daño con desarreglos de estructuras específicas de células epidérmicas como los MTs del citoesqueleto, colocándose como una contribución al campo de la terapia foto-dinámica y respuestas cito-esquelétales. Otras investigaciones deberían ser llevadas cabo para corroborar la explicación. Podríamos por tanto estar frente a un modelo experimental "in vivo" de TFD, en donde la química presente en la infusión de *F.carica*, probablemente compuestos con propiedades foto-activas, se convierten en una potencial fuente de posible moléculas foto activas a ser utilizadas, luego de ser sometidas a mayores evaluaciones biológicas, como compuestos naturales aplicables en la destrucción de procesos celulares neoplásicos.

Agradecimiento

Al Dr. Juan Carlos Stockert de la Unidad de Biología Celular de la Universidad Autónoma de Madrid por haber introducido el tema de la Terapia Foto-dinámica a través del intercambio científico establecido entre ambas instituciones.

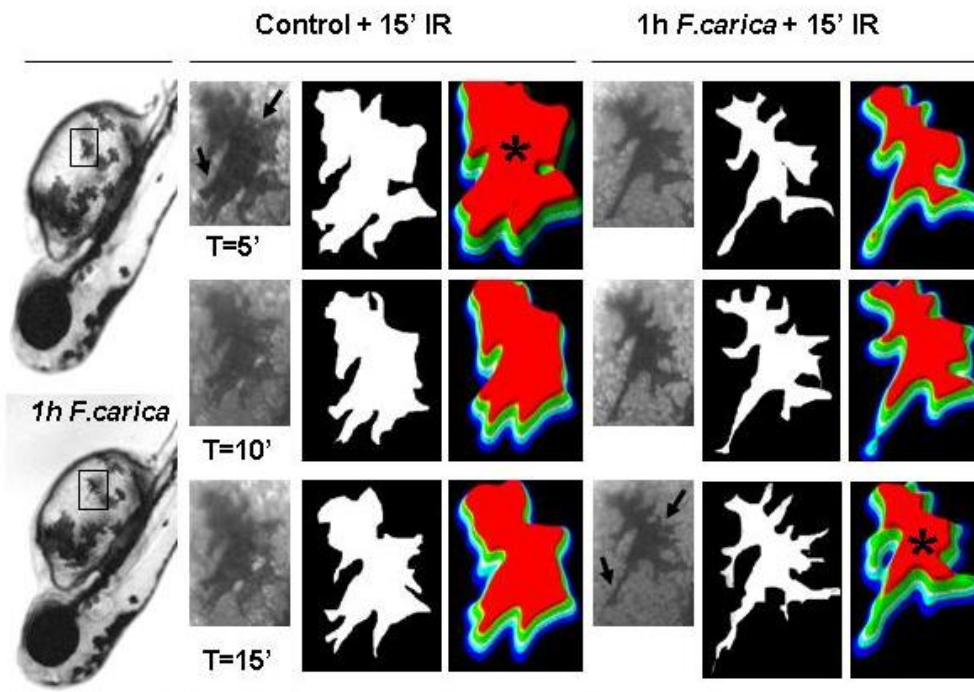


Fig.1. *F.carica* y el fotodaño en la citoarquitectura de melanoforos de pez cebra (*Danio rerio*). Se destaca el incremento de proyecciones citoplasmáticas y reducción del cuerpo celular . Análisis morfométrico ImageJ.

F. carica y el fotodaño en melanoforos de pez cebra (*Danio rerio*), en comparación con Azul de Metileno

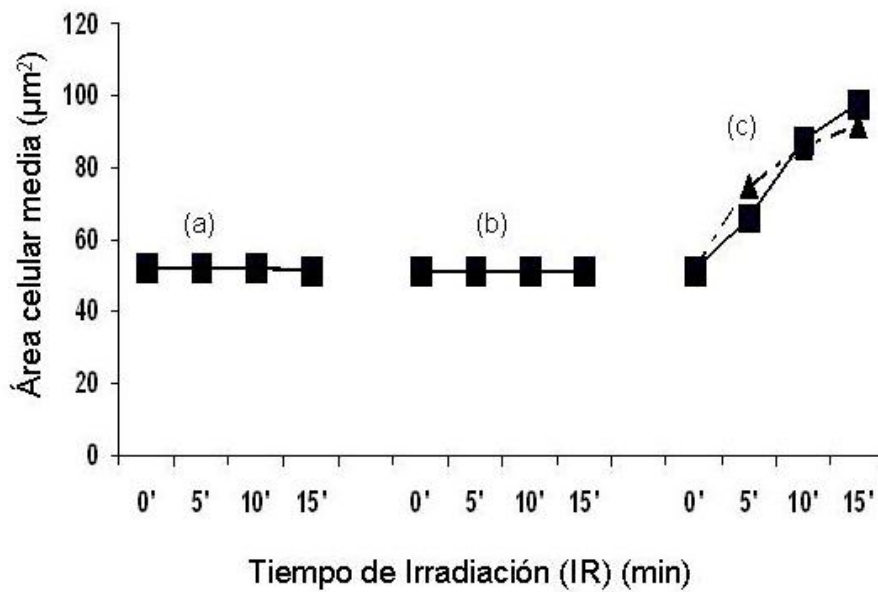


Fig.2. Representación gráfica del comportamiento del área celular media (μm^2) de melanoforos de pez cebra de 72 hpf: a) Control=solución Tyrodes (+IR) b) Infusión C_{1:10} de *F. carica* (-IR), c) Infusión (+IR). Se muestra el paralelismo del comportamiento de los melanoforos en presencia de AM 1% (\blacktriangle).

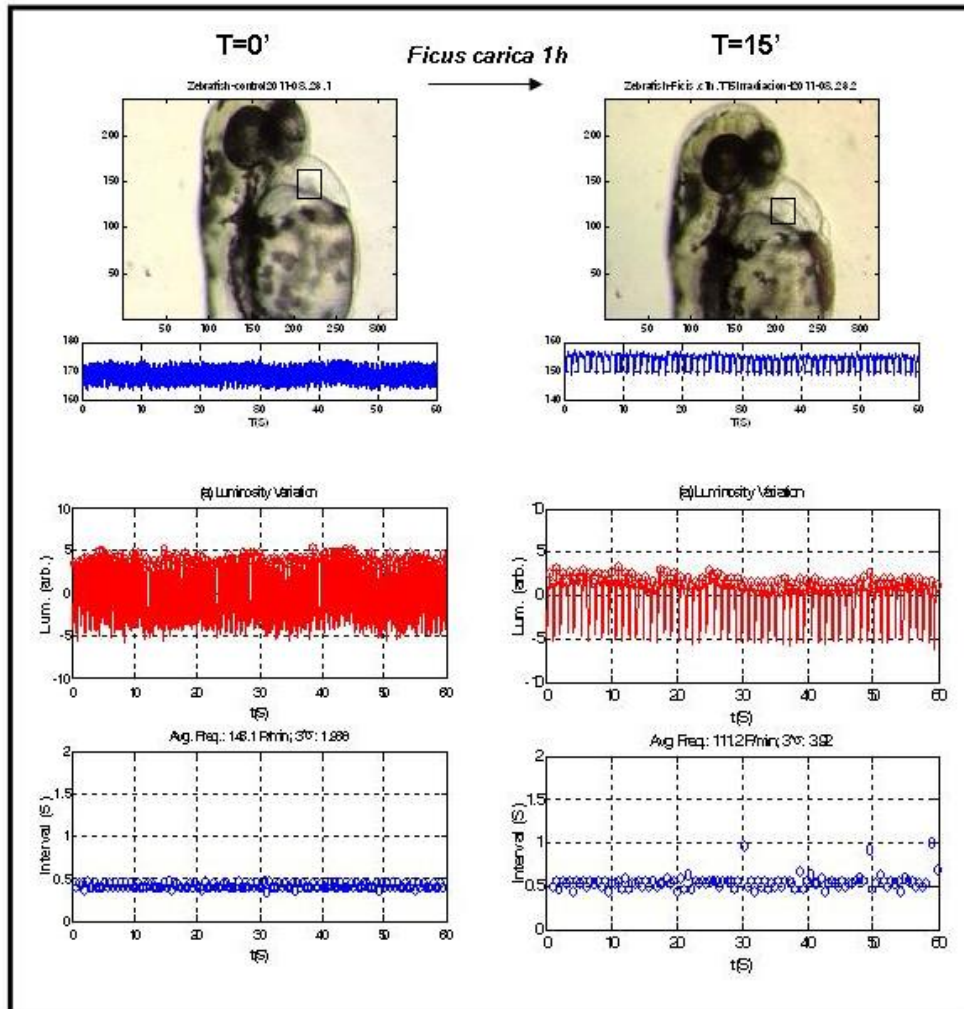


Fig.3. Variación de frecuencia cardíaca promedio (FCP), obtenidos por Videocardiograma (VCD). A) estado inicial B) Transcurrido una hora de incubación con la Infusión de *F.carica* (*Danio rerio*) y 15' de irradiación.

Bibliografía

1. Menéndez N.JL. *Ficus carica*. Asturnatura.com [en línea].Numero 176, 20/04/08 [consultado el: 06/04/2011]. Disponible en <http://asturnatura.com/especie/Ficus-carica.html> ISSN 1887-5068.
2. Yin WP, Chen HM, Wang TX, Cai MS. Studies on the structure and antitumor activities of two new compounds isolated from fig (*Ficus carica*). *Chim.Tradit.Herb Drugs*. 1998; Vol 29(8): 505-507.
3. Yin WP, Chen HM, Wang TX, Cai MS . A new coumarin compound with anticancer activity. *Chim.Tradit.Herb Drugs*. 1997; Vol 28(1): 3-4.
4. Chunyan Chi, Bo Chi, Ping L, Jingmei L, Ito Y. Isolation and purification of psoralen and bergapteno from *Ficus carica* | Leaves by high-speed countercurrent chromatography. *J.Liq.Chromatogr Technol*. 2009; 32(1): 136-143.
5. Feldman SR. Psoralen plus ultraviolet a light phototherapy effectiveness. *J.Am.Acad.Dermatol*. 2010; Vol 63 (4): 718-719.
6. Amatruda JF, Shepard, JL, Stern HM, Zon LI. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* 2002; Vol 1(3): 229-231.
7. Adrian JH, Hiroki T, Warren H, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 2005; 86(1): 6-19.
8. Shiraki T, Kojima D, Fukada Y. Light-induced body color change in developing Zebrafish. *Photochem Photobiol Sci*. 2010; Vol 9(1): 1498-1504.
9. Lister JA. Development of pigment cells in the Zebrafish embryo. *Microsc Res Tech*. 2002; Vol 58: 435-441.
- 10.Kimmel B.Ch, Ballard W.W, Kimmel RS, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the Zebrafish. *Developmental Dynamic*.1995; Vol 310: 203-253.
- 11.Sequera D, Ercolino JM, Álvarez M. Embrion de pollo: un modelo con cardiograma para el estudio de la toxicidad experimental inducida por *Thevetia peruviana*. *RETEL* 2010; Vol 28: 37-48.
- 12.Blázquez-Castro A, Stockert JC, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Juarranz A. Diferencial photodynamic response of culture cells to methylen blue and toluidine blue: role of dark redox processes. *Photochem. Photobiol. Sci*. 2009; Vol 8: 371-376.
- 13.Álvarez M, Villanueva A, Acedo P, Cañete M, Stockert J.C. Cell death causes relocalization of photosensitizing fluorescent probes. *Acta Histochem*. 2011; 11(3): 363-368.
- 14.A. Villanueva, R. Vidania, J.C. Stockert, M. Cañete, A, Juarranz. Photodynamic effects on culture tumor cells. Cytoskeleton alteration and cell death mechanisms. *Handbook of Photochemistry and Photobiology*. Edited by H.S.Nalwa 2003; Vol 4; Cap 3: 79-117.

15. Jordan M.A, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*.2004; Vol 4(4): 253-265.
16. Stockert J.C, Cañete M, Juarranz A, Villanueva A, Horobin R.W, Borrell J.I, Teixido J, Nonell S. Porphycenes: Facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. *Current .Medical. Chemistry*. 2007; Vol14: 997-1029.
17. Ali SA, Sultan T, Galgut JM, Sharma R, Meiter KV, Alí AS. In vitro responses of fish melanophores to lyophilized extracts of *Psoralea corylifolia* seeds and pure psoralen. *Pharm Biol* 2011; Vol 49 (4): 422-427.
18. Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 2003; Vol 8(5): 413-450.
19. Rello-Varona S, Gaméz A, Moreno J, Stockert J.C, Cristóbal J, Pacheco M, Cañete M, Juarranz A, Villanueva A. Metaphase arrest and cell death induce by etoposide on HeLa cells. *Int.J.Biochem.Cell.Biol*. 2006; Vol 38(12): 2183-2195.

Recibido: 08/12/11

Aceptado: 12/12/11