

COMPROBACION DE LA ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE Y CAPTADORA DE RADICALES LIBRES OXIGENADOS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Curatella americana* L.

LUIS FERNANDO OSPINA G.*
 JORGE E. OLARTE C.*
 JAIRO CALLE A.*
 ROBERTO PINZÓN S.*

RESUMEN

La actividad hipoglicemiante - antidiabética de una fracción del extracto clorofórmico de la corteza de *Curatella americana* L. ("chaparro") fue evaluada en ratones normoglicémicos y en ratas diabéticas por aloxano, en ensayos agudos y de administración crónica. Junto con los niveles de glicemia se determinó el nivel de insulina (Enzymun-Test® insulina, técnica ELISA). Se probó también la actividad contra radical superóxido (Sistema Xantina/Xantina Oxidasa), radical hidroxilo (Sistema H_2O_2/Fe^{3+} -EDTA/Ascorbato) y ácido hipocloroso (Sistema $NaOCl/H_2SO_4$).

Se encontró un importante efecto antihiperlipglicemiante, un efecto protector contra la diabetes aloxánica y disminución de la glicemia en el estado diabético. Los extractos mostraron una marcada actividad contra radical superóxido y menos importante contra HOCl. La actividad contra radicales hidroxilo y peroxilo estuvo interferida por el vehículo (MeOH). La actividad antidiabética del extracto podría estar mediada por los supuestos atrapadores de "Especies Oxígeno - Reactivas".

SUMMARY

The hypoglycemic - antidiabetic activity of one fraction from the chloroformic extract of the stem bark of *Curatella americana* L. was evaluated by means of acute as well as chronic administration of the fraction to normoglycemic mice and aloxan diabetic rats. It was measured glucose and insulin levels (Enzymun-Test® Insulin, ELISA). It was also determined activity against superoxide radical (Xanthine - Xanthine Oxidase System), hydroxyl radical (H_2O_2/Fe^{3+} - EDTA/Ascorbate System), hypochlorous acid ($NaOCl/H_2SO_4$ System) and peroxy radical (ABAP-Lisozyme System).

The results showed anti-hyperglycemic effect, protector effect against aloxan - induced diabetes and lower of glucose levels in the diabetic animals. The extracts exhibited a potent activity against superoxide radical and less important against HOCl. The activity against hydroxyl and peroxy radicals was interfered by the vehicle (MeOH). Our present results thus suggest that antidiabetic activity could be mediated by the supposed scavenger of "Reactive Oxygen - Species".

INTRODUCCION

Los radicales libres de oxígeno, mejor denominados como "Especies de Oxígeno Reactivo (EOR)" son entidades normalmente presentes en los seres vivos donde, si bien cumplen un papel fisiológico, el desequilibrio en el balance "producción de EOR/destrucción por sistemas antioxidantes", en favor de los pro-oxidantes, genera el llamado estrés oxidativo, que se acumula llevando a diversos estados fisiopatológicos (1). De estas especies reactivas se dice que están implicadas en más de 50 enfermedades humanas (2), entre ellas: aterosclerosis, cáncer, diabetes, envejecimiento y aquellas que cursan con procesos inflamatorios (3,4). Un supuesto "Scavenger" (barrendero, atrapador de radicales libres) cabe dentro de la denominación más amplia de antioxidante y su finalidad es retardar o prevenir significativamente, in vivo, la oxidación de substratos como proteínas, lípidos, DNA y carbohidratos (2,5).

La participación de las EOR en la etiopatogenia de la *Diabetes mellitus* experimental ha sido resumida en la llamada "Hipótesis de Okamoto": tanto el aloxano como la estreptozotocina, dos agentes diabéticos con toxicidad selectiva sobre las células beta-pancreáticas, generan peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo que se acumula produciendo luego fragmentación del DNA; daño que no alcanza a ser reparado por las células beta llevándolas así a su destrucción (2,6). También las EOR aparecen implicadas en las complicaciones tardías de la *Diabetes mellitus* (7).

Resulta de gran interés encontrar en un mismo extracto vegetal principios activos antidiabéticos y captadores de radicales libres. Esta maravillosa coincidencia no abunda en la literatura pero dos ejemplos típicos son el *Eucalyptus globulus* Labill. (8,9) y la *Momordica charantia* L. (10,11).

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490. Santafé de Bogotá. Colombia.

Justificación : Las consideraciones anteriores nos llevaron a plantear la siguiente hipótesis de trabajo: si el uso popular de la *Curatella americana* L. como antidiabético tiene una base racional, y si los principios activos derivados de su corteza muestran actividad captadora de radicales libres, los mediadores de la actividad antidiabética podrían ser los supuestos captadores de radicales. Además, en la actividad "scavenger" de esta planta estaría la base racional para otros usos medicinales.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal : La corteza de *Curatella americana* L. (Herbario del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, No. 358308) fue recolectada en julio de 1.994 en la Base Militar de Tolimaida (Melgar - Tolima), a una altitud aproximada de 500 m.s.n.m. y temperatura de 25 °C. El material se sometió a secado durante 72 horas a 45 °C en estufa de aire circulante. El polvo seco resultante de la molienda fue sometido a una marcha fitoquímica preliminar (12). Aproximadamente 4 Kg de polvo seco fueron sometidos a extracción por reflujo con éter de petróleo (punto de ebullición 40 - 60 °C) y el extracto obtenido fue filtrado en caliente. En forma similar, el material vegetal "desengrasado" fue sometido a extracción con cloroformo y después de retirar la mayor cantidad posible de ceras se fraccionó empleando cromatografía en columna con gel de sílice para columna y siguiendo un gradiente de elución con mezclas de n-hexano : CHCl₃ : Me₂CO.

Animales de Experimentación : Los ensayos de actividad hipoglicémica - antidiabética se realizaron en ratas hembras de la colonia WISTAR y en ratones hembras de la colonia OF1 procedentes del INS, criados y mantenidos en el Bioterio de Experimentación del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, bajo rigurosos esquemas de fotoperiodo (12 horas luz - 12 horas oscuridad), temperatura (21 ± 1 °C), humedad, agua y comida *ad libitum* y sanitización de su micro y macroambiente.

Diabetes Experimental : La diabetes fue inducida mediante inyección IV (vena lateral de la cola) de aloxano en dosis de 50 mg/Kg (ratas de 6 - 8 semanas de edad, peso inicial 100 - 120 g) y 55 mg/Kg (ratones de 6 - 8 semanas de edad, peso inicial 25 - 30 g). A las 120 horas de inyectado el aloxano sólo aquellos animales que tuvieron niveles de glucosa en sangre mayor de 200 mg/dL, sin ayuno, fueron considerados diabéticos aptos para los ensayos.

Determinación de Glucosa y de Insulina : Los niveles de glucosa en sangre (NGS) se determinaron por el método enzimático GOD-PAP de Merck (A_{500 nm}, Spectronic 20) en plasma de muestras de sangre, extraídas mediante capilares

heparinizados, del seno retro-orbital de los animales. Para ello las ratas debieron ser anestesiadas con vapores de éter etílico.

Los niveles de insulina se determinaron por el método Enzymun-Test® Insulina (13) (Boehringer Mannheim, Grünenthal Colombiana) en suero obtenido de ratas mediante sangrado de la aorta descendente con un sistema Vacutainer®. Este sangrado se realizó en el animal anestesiado con uretano al 12.5 % (10 mL/Kg). Las absorbancias para la evaluación de insulina se determinaron en un espectrofotómetro UV/VIS UNICAM UV 2-100. El manejo de la técnica Enzymun-Test® Insulina se realizó inicialmente en forma automatizada empleando el sistema ES33 Bohringer Mannheim (Grünenthal Colombiana) antes de realizar el procedimiento en forma completamente manual.

Ensayos de Actividad Hipoglicémica - Antidiabética

La fracción más polar, denominada F5, se empleó para los ensayos biológicos. Para administración a los animales se empleó un co-precipitado F5 - PVP fácil de suspender.

a. Ensayo de Tolerancia a la Glucosa : Ratones normoglicémicos sometidos a un ayuno de 18 horas recibieron por vía oral los extractos (50 mg/Kg) una hora antes de recibir una sobrecarga oral de glucosa (2 g/Kg). Los NGS se determinaron a las horas 0, 1, 2 y 4 después de la sobrecarga oral de glucosa (SOG). El ensayo se realizó administrando el extracto (50 mg/Kg) durante 10 días antes de la prueba de la tolerancia a la glucosa. n = 10 animales/grupo.

b. Ensayo de Actividad Antidiabética : Ratones normoglicémicos fueron tratados con el extracto (50 mg/Kg) durante 10 días antes de inducir la diabetes aloxánica como fue descrito. n = 10 animales/grupo.

c. Administración Crónica en Animales Diabéticos : Se emplearon ratas diabéticas por aloxano. El extracto se administró mediante sonda intragástrica cada día durante 30 días. Los NGS y de Insulina se determinaron los días -5 (aloxanización), 0 (inicio del tratamiento), 30 (final del tratamiento) y 45 (final del ensayo). Los grupos experimentales consistieron de 6 animales tratados y 6 controles.

Ensayos de Actividad Captadora de Radicales Libres

Todos los reactivos empleados en estos ensayos fueron adquiridos a las firmas SIGMA y MERCK.

En todos los ensayos los extractos disueltos en metanol se probaron en concentración final Cf = 50; 25; 12.5 y 6.25 µg/mL.

Las absorbancias y las cinéticas de las técnicas de radicales libres fueron determinadas en un espectrofotómetro UV/VIS UNICAM UV 2-100.

a. Generación de Radical Superóxido (14,15) : Este radical se generó al incubar el sistema Hipoxantina / Xantina Oxidasa (XO), y su poder reductor sobre el Azul de Nitrotetrazolio (NBT) se determinó por la formación del diformazán (cromóforo con máximo de absorción a 560 nm).

Experimento control: Para evaluar una posible inhibición de la xantina oxidasa se determinó la formación de ácido úrico a 295 nm, en presencia del supuesto captador.

b. Generación de Radical Hidroxilo (14,15) : El radical hidroxilo se generó por el sistema: H_2O_2 / Fe^{3+} -EDTA / Ascorbato. La magnitud de la degradación que este radical causa a la desoxirribosa, para dar fragmentos que reaccionan con TBA (Acido Tiobarbitúrico), se determinó por el método del TBA: formación de cromóforos con un máximo de absorción a 532 nm.

Experimento control: Ensayo en ausencia de ascorbato para evaluar un posible efecto pro-oxidante de los extractos.

c. Generación de Acido Hipocloroso (14,15) : Sistema: $NaOCl / H_2SO_4$. El daño causado por el HOCl sobre la α_1 -antitripsina se determinó a través de la inhibición que esta última causa sobre la elastasa. La actividad de elastasa sobre su sustrato N-succinil-ala-ala-ala-p-nitroanilida se evaluó midiendo la variación de absorbancia a 410 nm.

d. Generación de Radical Peroxilo (14,16) : Sistema ABAP/Lisozima. Los radicales peroxilo se generaron por la descomposición térmica del ABAP [2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano)] y se determinó el daño causado sobre la lisozima al medir la pérdida de turbidez (ÅA 490 nm) de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*. Experimento control: Actividad de lisozima en presencia de los extractos.

Estadística

Para los ensayos de actividad antidiabética se empleó un diseño de bloques completos al azar y los resultados fueron sometidos a la prueba "t" de Student, análisis de varianza por dos vías y posteriormente test de comparaciones múltiples (Tukey).

RESULTADOS Y DISCUSION

Aspectos Fitoquímicos

En el análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de la corteza se encontraron taninos, cumarinas y esteroides y/o triterpenoides. La presencia de taninos y triterpenos en esta planta está reportada en la literatura (17).

La CCD de F5 indica que se trata de una mezcla poco compleja, constituida al parecer por residuos de ceras y por compuestos con perfil cromatográfico similar a los patrones β -Sitosterol y Estigmasterol. En el espectro IR de F5 se observan bandas características de carbonilo (ceras?) y de hidroxilo (esteroides?).

Ensayos de Actividad Hipoglicemiante - Antidiabética

Ensayo de Sobrecarga Oral de Glucosa (SOG)

Los resultados aparecen en la Gráfica No. 1. En animales normoglicémicos la administración de una SOG causó un aumento pronunciado en los NGS en la primera hora postcarga, para regresar paulatinamente hacia los niveles basales de glucosa. La administración de F5 a ratones durante 10 días previos a la SOG atenuó la hiperglicemia drástica de la primera hora y mantuvo este efecto en forma significativa a las dos horas. Este resultado puede definirse como un efecto antihiperglicemiante de F5 y no como hipoglicemiante pues en ningún momento el extracto logró bajar los NGS a valores inferiores a los de glicemia basal. La administración repetida de PVP haciendo parte del vehículo en que se suspendió F5 tuvo efecto idéntico al del grupo "blanco" (agua destilada) en la prueba de SOG.

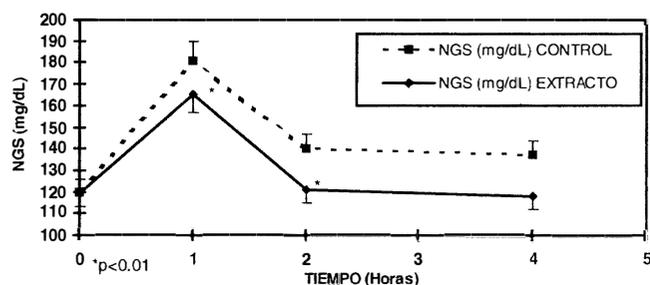


Figura No. 1: Modificación de la Tolerancia a la Glucosa por el Extracto de *Curatella americana* L.

Ensayo de Actividad Antidiabética

Los resultados expresados en la Gráfica No. 2 dejan ver la importancia de haber protegido a los ratones administrándoles la fracción F5 durante 10 días antes de inducir la diabetes aloxánica. En el grupo tratado se presentaron porcentajes de diabéticos significativamente menores a los del grupo no protegido. Los animales que resultaron diabéticos en el grupo tratado con F5 presentaron NGS menores que los diabéticos del grupo control, resultado que puede interpretarse como un efecto antidiabético de F5 siendo además la diabetes resultante moderada si se tiene en cuenta los NGS. Otros parámetros del

biomodelo diabético como son poliuria, polifagia y polidipsia fueron indistintos en los dos grupos experimentales.

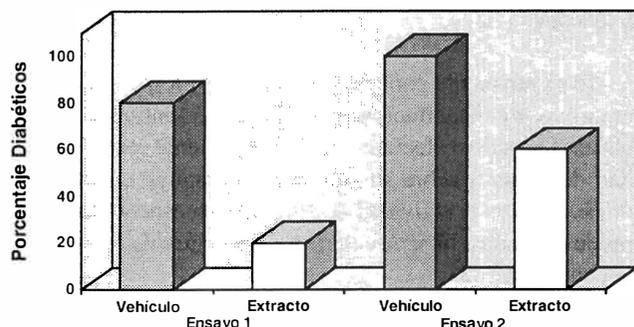


Figura No. 2 : Efecto del Extracto de *Curatella americana* L. en la Inducción de Diabetes Aloxiánica

En un estudio sobre la actividad antihiperlipémica de la *Centaurea seridis* los autores aislaron como principio activo responsable de dicha actividad el β -sitosterol-3- β -D-glucósido (18). Dentro de los componentes de la fracción F5 hay principios activos que dieron prueba positiva para esteroides y que tuvieron además un perfil cromatográfico similar a β -Sitosterol y Estigmasterol. La actividad antidiabética encontrada en la corteza de *Curatella americana* L. debe ser atribuida a la fracción F5 como tal ya que no se aislaron sus componentes.

Administración Crónica en Animales Diabéticos

Los NGS y los niveles de insulina se presentan en las Gráficas Nos. 3 y 4. El tratamiento de las ratas con F5 durante 30 días permitió un descenso de NGS hasta el rango de valores normoglicémicos sin que esto represente una reversión de la diabetes pues la glucosa es solo un aspecto puntual de la disfunción múltiple que sufre un biomodelo diabético. El efecto logrado sobre los NGS se mantuvo aún por 15 días

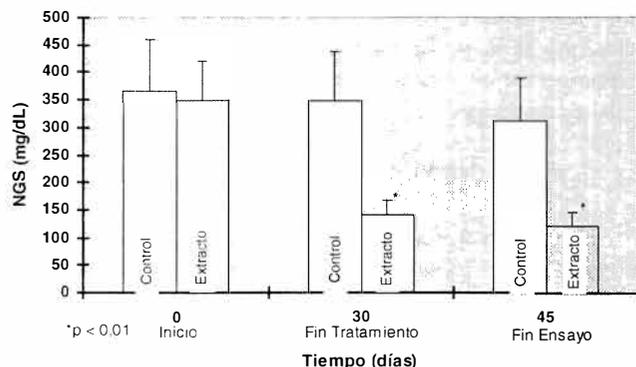


Figura No. 3 : Variación de los NGS por la Administración Crónica del Extracto de *Curatella americana* L. en Animales Diabéticos.

después de suspendido el tratamiento. Con periodos de observación más largos para un grupo satélite podría definirse el momento al cual, por ausencia de tratamiento, empeorarían de nuevo los NGS.

Al realizar manualmente el método Enzymun-Test® Insulina no se logra la misma reproducibilidad de los datos que cuando se realiza en forma automatizada. Se deben minimizar al mejor nivel posible los errores en medición de volúmenes -manejo de micropipetas- y, al momento de lavar el exceso de conjugado de anticuerpos esta operación debe realizarse dos veces con un intervalo de 5 minutos entre un lavado y otro antes de desarrollar el color final. Con un lavado sencillo las muestras de los animales se afectan más que los patrones de insulina dando coloraciones intensas con absorbancias por fuera de la curva de calibración, cuando previamente se conocía que en el sistema automatizado estas muestras daban valores bajos de insulina.

El kit Enzymun-Test® Insulina se diseñó originalmente para determinar insulina humana pero ha sido aplicado a la determinación de insulina en ratones (19) y en perros (20); en este último caso también se ha reportado una sobreestimación del valor real de insulina pero dentro del rango que se supone normal para dicha especie animal. Para adecuar una escala de insulina acorde con los valores esperados en ratas normoglicémicas fue necesario preparar nuevos patrones diluyendo los patrones del kit comercial con albúmina bovina al 22%. En el rango de insulina menor que 90 μ U/mL se obtuvo un comportamiento de los datos asimilable a una recta con la cual se calcularon, por interpolación, los valores de insulina de las muestras.

Al día 30 del tratamiento crónico de las ratas Wistar con la fracción F5 se encontraron valores de insulina moderadamente bajos, que indican que la diabetes aloxiánica lograda dejó una importante actividad residual de células β -pancreáticas. Estos niveles de insulina fueron similares en los grupos tratado y control, lo cual reflejaría que no hubo mejoría

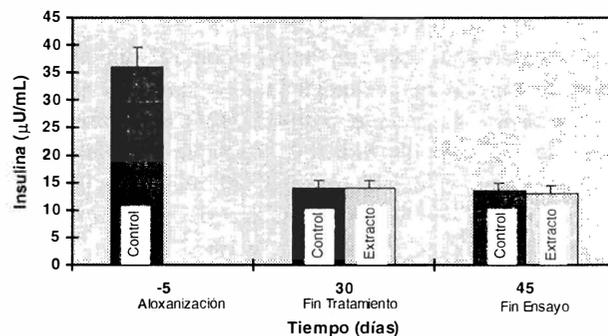


Figura No. 4 : Variación de los Niveles de Insulina por la Administración Crónica del Extracto de *Curatella americana* L. en Animales Diabéticos.

en la producción de insulina por efecto del extracto. Los valores no cayeron después de 15 días de suspendido el tratamiento.

Ninguno de los animales que hicieron parte del experimento murió durante o al suspender el tratamiento por causa relacionada con el extracto o su vehículo. La observación de los animales sacrificados no reveló signos macroscópicos de toxicidad en órganos como hígado, riñón, corazón, pulmón e intestinos.

Actividad Anti-radicalaria

El atrapamiento de radical superóxido generado por el sistema Hipoxantina / Xantina Oxidasa se expresa como porcentaje de inhibición de la reducción de NBT:

<u>COMPUESTOS</u>	<u>INHIBICION NBT (%)</u>
SOD (Superóxido Dismutasa Cf: 25 U/mL)	87.2
n-propilgalato(Cf: 100 µM)	85.2
F5 (Cf: 50; 25; 12.5 y 6.25 µg/mL)	48.3 ; 47.0; 42.3 y 40.9

La velocidad de formación de ácido úrico al reaccionar la XO con su sustrato Hipoxantina, en presencia de F5 en su concentración más alta, fue similar a la de la enzima en ausencia del extracto.

F5 produjo inhibiciones en la reducción de NBT entre 41 - 49 %, que guardan una mínima relación concentración - inhibición. Esta actividad captadora de radical superóxido corresponde, en promedio, a un 50 % de la actividad de los patrones utilizados. F5 no produjo ninguna interferencia con la actividad enzimática de XO, mientras que Alopurinol inhibió la enzima en un 100 %. Así, la actividad anti-radical superóxido de F5 le es propia.

Frente al radical hidroxilo tanto F5 como el vehículo y el patrón dieron porcentajes de captación superiores al 90%. Esto era de esperarse con el patrón DMSO, un inhibidor de referencia. El vehículo metanol, igual que lo harían otros solventes como el etanol, mostró una alta capacidad de captación del radical hidroxilo: efecto que enmascaró notablemente la actividad de F5 contra dicho radical.

La actividad de F5 como captador de HOCl dio los siguientes resultados:

<u>COMPUESTO</u>	<u>CAPTACION (%)</u>
Acido Ascórbico (Cf: 100 µM)	64.4
Fenilbutazona(Cf: 100 µM)	75.0
F5 (Cf: 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL)	29.5, 22.7, 15.9 y 12.9
Vehículo	3.8

El experimento control demostró que en presencia de F5 en su mayor concentración la actividad de α_1 -antitripsina sobre elastasa no se vio afectada significativamente, pero la actividad de elastasa sobre su sustrato disminuyó en promedio 9.6%. Si bien la actividad de F5 contra la especie HOCl fue modesta, parece libre de interferencias y guarda relación con la concentración.

La inhibición de lisozima en presencia de F5 fue menor del 10%, lo que significa que hubo más del 90% de protección por efecto captador sobre los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del ABAP. Este efecto protector podría deberse en parte a la presencia de los componentes de F5 pero, indudablemente, la participación del vehículo tiene una gran responsabilidad en este resultado.

Con n-propilgalato se esperaba una protección mucho más alta. Al parecer, algún tipo de degradación sufrió este compuesto en el medio de reacción pues sus soluciones desarrollaron un leve color amarillo. Con α -tocoferol, al contrario de lo esperado, se encontró una alta protección de la lisozima. Este último resultado se debe a la participación del vehículo hidroalcohólico del α -tocoferol, ya que la relativa insolubilidad de este último en medios acuosos no lo hace un antioxidante conveniente para atrapar radicales peroxilo hidrosolubles (16).

Comentario Final

La fracción F5 del extracto de corteza de *Curatella americana* L. presentó tanto actividad antihiperlipémica/antidiabética como captadora de EOR. Estos resultados constituyen una buena aproximación a la resolución de la hipótesis que se planteó para este trabajo, la cual podría aclararse en la medida en que se aislen los principios activos responsables de estas actividades y se investiguen sus mecanismos de acción.

CONCLUSIONES

El extracto clorofórmico de la corteza de *Curatella americana* L. posee principios activos que mostraron una marcada actividad contra radical superóxido y de menor magnitud contra HOCl. Si bien la actividad captadora de radicales hidroxilo y peroxilo fue alta ésta se debe en gran parte al efecto captador del vehículo del extracto.

Estos mismos principios activos mostraron efecto antihiperlipémico significativo en animales normoglicémicos, protegieron parcialmente contra la diabetes aloxánica y mejoraron los NGS en animales diabéticos sin que esto se acompañara de una mejoría en la producción de insulina.

AGRADECIMIENTOS :

Este trabajo se desarrolló en la Universidad Nacional de Colombia bajo el Programa "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas" financiado por Colciencias. Los autores agradecen el apoyo recibido de estas instituciones y del programa de Posgrado en Farmacología.

BIBLIOGRAFIA

- H. Sies. *Am. J. Med.*, **91** (suppl 3C), 31, (1991)
- B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. "Free Radicals in Biology and Medicine", 2 ed., Clarendon Press - Oxford, 1989.
- J. Pré. *Sem Hop Paris*, **69** (1 - 2), 29, (1993).
- P. A. Southorn, G. Powis. *Mayo Clin. Proc.*, **63**, 390, (1988).
- B. Halliwell. *Free Rad. Res. Comms.*, **9** (11), 1, (1990).
- N. Takasu, et al. *Diabetes*, **40**, 1141, (1991).
- J.C. Momboisse, et al. Production of Superoxide Anion by Glycated Proteins: Involvement in Complications of Diabetes mellitus. In : "Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine". Plenum Press, New York, 1990, p. 551.
- K. Boukef. *Plant. Med. et Phytothér.*, **10** (12), 119, (1976).
- T. Osawa, M. Namiki. *Agric. Biol. Chem.*, **45** (3), 735, (1981).
- S. S. Handa, A.S. Chawla, Maninder. *Fitoterapia*, **60** (3), 195, (1989).
- M.N.A.R. Sreejayan. *Fitoterapia*, **62** (4), 344, (1991).
- A. Sanabria G. "Análisis Fitoquímico Preliminar: Metodología y su Aplicación en la Evaluación de 40 Plantas de la Familia Compositae". Universidad Nacional de Colombia. 1983.
- Enzymun-Test® Insulina. Boehringer Mannheim Diagnostica, 1990.
- M. Payá, B. Halliwell, J. R. S. Hoult. *Biochem. Pharmacol.*, **44** (2), 205, (1992).
- M.C. Terencio S., M.C. Montesinos M. Radicales Libres. Curso Internacional "Técnicas de Estudio de Fármacos Activos a Nivel de Inflamación y otros Procesos Medidos por Radicales Libres". Universidad de Valencia. España. 1993.
- M. Payá, B. Halliwell, J. R. S. Hoult. *Free Rad. Res. Comms.*, **17** (5), 293, (1992).
- Ethnomedical Information on *Curatella americana* L. Base de Datos NAPRALERT, Costa Rica, Octubre de 1992.
- A. Villar, M. Payá. *Plant. Med. et Phytothér.*, **19** (1), 4, (1985).
- H. Beppu, Y. Nagamura, K. Fujita. *Phytotherapy Research*, **7**, 937, (1993).
- R. Hoier, A. L. Jensen. *Zentralbl-Veterinarmed-A.*, **40** (1), **26**, (1993). Original no consultado. Base de Datos MEDLINE® 1993, SIDES, Santafé de Bogotá.