

Rol de la Vitamina E en el Tubo Neural de Embriones y Fetos de Ratón (*Mus musculus*) Tratados con Ácido Valproico: Estudio Inmunohistoquímico de Sonic Hedgehog

Role of Vitamin E in Neural Tube of Mouse (*Mus musculus*) Embryos and Fetuses treated with Valproic Acid: Immunohistochemical Study of Sonic Hedgehog

Daniel Conei Valencia^{*,**,*}; Bárbara Soler Guerra^{*}; Gustavo Saint-Pierre Contreras^{*} & Mariana Rojas Rauco^{***}

CONEI, V. D.; SOLER, G. B.; SAINT-PIERRE, C. G. & ROJAS, R. M. Rol de la vitamina E en el tubo neural de embriones y fetos de ratón (*Mus musculus*) tratados con ácido valproico: Estudio inmunohistoquímico de Sonic hedgehog. *Int. J. Morphol.*, 34(3):1044-1050, 2016.

RESUMEN: Sonic hedgehog (SHH) es un morfógeno esencial para el desarrollo del tubo neural, miembros y somitos. Variaciones en su expresión pueden ocasionar alteraciones en el sistema nervioso. Esto lo producen teratógenos, como el ácido valproico (VPA), el cual aumenta las especies reactivas de oxígeno, pudiendo contrarrestarse con la administración de vitamina E (VE). Se buscó determinar la expresión de SHH en tubo neural y médula espinal en embriones y fetos de ratones expuestos a VPA, VPA + VE y VE. Se conformaron 8 grupos de ratones hembra (*Mus musculus*). A los 8 días post-coito (p.c.) se les administró a los grupos 1 y 5 suero fisiológico 0,3 ml; grupos 2 y 6 VPA 600 mg/kg; grupos 3 y 7 VPA 600 mg/kg + VE 200 UI/kg; grupos 4 y 8 VE 200 UI/kg, todos los tratamientos vía oral. A los 12 días p.c., se sacrificaron los grupos 1, 2, 3 y 4, y a los 17 días los restantes. Fueron fijados en solución Bouin e incluidos en paraplast. Se realizaron cortes transversales a nivel torácico. Se utilizó anticuerpo policlonal anti-SHH (Santa Cruz, H-160, conejo), dilución 1:100. Se describió la morfología de las muestras marcadas positivamente, se midió la densidad óptica integrada y porcentaje de área inmunoreactiva. La expresión de SHH fue inmunopositiva en notocorda y placa del piso del tubo neural solo en embriones de 12 días p.c. Los grupos tratados con VPA+VE y VE presentaron mayor intensidad inmunohistoquímica y porcentaje de área inmunoreactiva en comparación al grupo tratado con VPA ($p \leq 0,0001$) en la placa del piso, siendo similar al grupo control. En la notocorda, la intensidad de inmunoreacción fue similar a lo demostrado en la placa del piso, con diferencias significativas ($p \leq 0,0001$), pero el porcentaje de área no arrojó diferencias. Los grupos de 17 días de gestación resultaron negativos a la expresión de SHH. La vitamina E regula la expresión de SHH en tubo neural, atenuando así los efectos del VPA.

PALABRAS CLAVE: Sonic hedgehog; Ácido valproico; Vitamina E; Morfógeno; Tubo neural.

INTRODUCTION

En el desarrollo embrionario ocurren una serie de procesos fundamentales para la formación de estructuras ordenadas, reguladas por morfógenos, que corresponden a moléculas orgánicas producidas y secretadas por un grupo de células embrionarias, las que al unirse a receptores de membrana gatillan una respuesta celular dependiente de su concentración (Tabata & Takei, 2004; Rojas *et al.*, 2014).

Sonic hedgehog (SHH) corresponde a un morfógeno esencial para el desarrollo normal de órganos y estructuras durante la etapa embrionaria, como tubo

neural, miembros, diferenciación de somitos, entre otros (Sheeba *et al.*, 2016). Referente al proceso de neurogénesis, el mecanismo planteado es que la notocorda libera SHH, la cual estimula a las células de la placa neural a formar la placa del suelo. Posteriormente, las mismas células de la placa del suelo producirán SHH, el cual sumado al que produce la notocorda, inducirá a las células de ambos lados de la placa del suelo a diferenciarse en motoneuronas (Cohen *et al.*, 2013). También la expresión de SHH en la notocorda juega un rol fundamental en el cierre del tubo neural (Patterson *et al.*, 2009).

* Laboratorio de Embriología Comparada, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

** Doctorado en Ciencias Morfológicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

*** Centro de Investigación en Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile, Chile.

Variaciones en la señalización de SHH puede producir diversas alteraciones, pudiendo ser malformaciones congénitas como holoprosencefalia, anomalías craneofaciales, exencefalia, espina bífida, entre otros, como también puede ocasionar cánceres, incluyendo carcinoma de células basales, gliomas malignos, meduloblastoma, leucemias, y cánceres de mama, pulmón, páncreas y próstata (Rimkus *et al.*, 2016).

Entre los fármacos capaces de ocasionar alteraciones en el desarrollo, se encuentra el ácido valproico (VPA), el anticonvulsivante más teratogénico, y es capaz de producir anomalías aun en dosis terapéuticas. La exposición de VPA durante la gestación puede triplicar la tasa de alteraciones, siendo la principal la espina bífida, además de anencefalia, cardíacas, craneofaciales, defectos esqueléticos y de los miembros, como también un conjunto de rasgos dismórficos denominado Síndrome Fetal del Ácido Valproico, con una disminución del crecimiento intrauterino (Ornoy, 2009).

El mecanismo a través del cual el VPA actúa como teratógeno es el aumento del estrés oxidativo. Es decir, se produce un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres, desencadenando un desequilibrio entre sistemas oxidantes y antioxidantes (Verrotti *et al.*, 2008). Esto provoca un daño directo en DNA, proteínas y lípidos, afectando las vías de señalización celular mediante la activación de factores de transcripción sensibles a óxido reducción, alterando procesos celulares claves en el desarrollo embrionario (Therond, 2006). En este sentido, se ha visto que el VPA altera en ciertas etapas del desarrollo embrionario la expresión de genes involucrados en la neurogénesis, como es el caso de SHH, lo cual tendría directa relación con los diversos efectos teratogénicos que produce el VPA (Oyabu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2012).

Además, los mecanismos de defensa antioxidantes tanto en el embrión como en el feto son inmaduros y tienen un desarrollo lento durante la gestación, por lo que el estrés oxidativo causaría daños irreversibles (Ornoy). Sumado a esto, se ha visto que el VPA disminuye la concentración de ciertos antioxidantes, como la vitamina E (VE), en el plasma (Al Deeb *et al.*, 2000).

Ante esto, existen estudios que avalan la administración exógena de VE para contrarrestar los daños que ocasiona el VPA, ya que al ser agente reductor es capaz de prevenir y neutralizar los radicales libres de oxígeno mediante la donación de electrones a especies oxidadas. De esta forma, interrumpe la reacción en cadena de formación de radicales libres, a diferencia de otros antioxidantes preventivos que evitan el inicio de la secuencia de reacciones (Niki, 2015).

En algunos estudios se ha reportado el efecto beneficioso de la VE en distintos modelos experimentales tratados con VPA. Además, se ha observado que la administración de VPA reduce la expresión de SHH en neuronas serotoninérgicas del cerebro posterior (Oyabu *et al.*). Sin embargo, no se ha evaluado su expresión en tubo neural y médula espinal, así como también los resultados derivados de la administración de VE.

Este trabajo tiene como propósito determinar la expresión de SHH en el tubo neural y médula espinal en embriones y fetos de ratones hembras expuestos a terapia antiepiléptica con ácido valproico, expuestos a esta terapia en conjunto con VE y expuestos sólo a VE de 12 y 17 días de gestación.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 40 ratones hembras jóvenes (*Mus musculus*), las que se dividieron en 8 grupos de 5 ratonas gestantes cada uno. Éstas se colocaron en jaulas con machos reproductivamente sanos y jóvenes. Se consideró como el día 1 de gestación el momento en que se verifica la presencia de tapón mucoso a nivel vaginal, lo que significa que hubo cópula.

A los 8 días post coital (p.c.) se procedió a dividir a las hembras gestantes en 8 grupos y recibieron los siguientes tratamientos vía oral en micropipetas de 200 µl:

- Los grupos 1 y 5 fueron tratados con 0,3 ml de suero fisiológico, conformando los grupos control (NaCl 0,9%).
- Los grupos 2 y 6 recibieron 600 mg/kg de ácido valproico (Atemperator[®], Laboratorio Recalcine[®]).
- A los grupos 3 y 7 se les administró 600 mg/kg de ácido valproico y 200 UI/kg de VE (Laboratorio Fasa[®]).
- A los grupos 4 y 8 se les suministró 200 UI/kg de VE.

A los 12 días p.c. las ratonas de los grupos 1, 2, 3 y 4 se anestesiaron y eutanasiaron con solución de eutanasia xilacina en dosis 1,1 a 2,2 mg/kg y ketamina en dosis de 10 a 20 mg/kg. Posteriormente, con la misma metodología se eutanasiaron los ratones de los grupos 5, 6, 7 y 8 correspondiente a los grupos de 17 días p.c.

Se realizó técnica inmunohistoquímica con anticuerpo anti-SHH. Los embriones y fetos fueron fijados en solución Bouin e incluidos en paraplast. Se obtuvieron cortes de

5 μm con micrótopo Microm (HM315R) a nivel torácico del tubo neural y médula espinal, los cuales se adhirieron a portaobjetos con carga positiva (Citoglas). Fueron adheridos 4 cortes por portaobjeto, considerando un total de 3 portaobjetos por muestra. La recuperación antigénica fue realizada en vaporera por 40 minutos, con los cortes sumergidos en solución desensambrante de antígenos (Vector Labs). Se realizó bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno en metanol y bloqueo inespecífico de proteínas con PBS+BSA al 3 %. Para la incubación con el anticuerpo primario anti-SHH (Santa Cruz Biotechnology, H-160, conejo) se usó una dilución 1:100 en PBS. Para la detección del anticuerpo primario se incubó con polímero conjugado con anticuerpo anti conejo y HRP durante 15 minutos. Como sustrato para la HRP se usó diaminobencidina (DAB, Vector Labs) durante 1-2 minutos.

El control negativo estuvo dado por el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica completa, pero sin considerar los anticuerpos primarios. Como control positivo se consideró la notocorda. Los cortes transversales seriados fueron analizados si resultaron marcados positivamente y fueron descritos morfológicamente.

Los cortes histológicos fueron fotografiados en un microscopio Zeiss con cámara fotográfica Cannon Power Shot A640 conectada a un computador. Se midió densidad óptica integrada (DOI) y porcentaje de área positiva para inmunotinción con el programa Image Pro Plus 9.1 (Mediacybernetics, USA) en placa del piso del tubo neural y notocorda. Los resultados fueron presentados como la media y desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc, USA). Se aplicó test de ANOVA para medidas anidadas y se consideró el valor de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

En los embriones de 12 días de gestación, todos los grupos presentaron inmunotinción positiva a SHH en la notocorda y en la placa del piso del tubo neural (Fig. 1). Con respecto a los fetos de 17 días de gestación, la inmunotinción resultó negativa a SHH en los 4 grupos estudiados, sin diferencias entre ellos.

En la placa del piso del tubo neural de los embriones de 12 días de gestación (Fig. 2), la intensidad de la inmunotinción en el grupo control presentó valor DOI de $0,39 \pm 0,006$. El grupo VPA mostró una reducida intensidad, con DOI $0,29 \pm 0,007$, encontrándose diferencias significati-

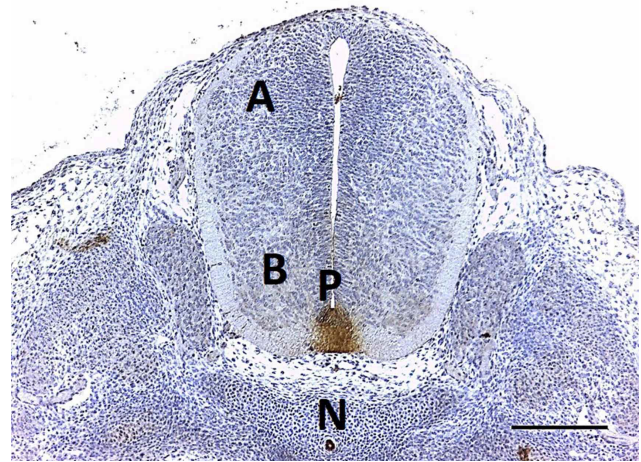


Fig. 1. Tubo neural de embriones de 12 días de gestación. Grupo control. (A) placa alar, (B) placa basal, (P) placa del piso, (N) notocorda. Anticuerpo anti-SHH. 100X. Se observa inmunotinción positiva en la placa del piso y notocorda. Barra 200 μm .

vas al compararlo con el grupo control ($p \leq 0,0001$). Al comparar este grupo con el grupo que se le administró VPA + VE, se evidencian diferencias estadísticamente significativas, presentando este último una reacción inmunohistoquímica con DOI de $0,37 \pm 0,013$. El grupo VE mostró DOI de $0,38 \pm 0,009$, lo cual al contrastarlo con el grupo VPA se observaron diferencias significativas. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control, VPA + VE y VE al compararlos entre sí.

El porcentaje de área con inmunotinción en la placa del piso también presentó diferencias estadísticamente significativas en la placa del piso ($p \leq 0,0001$). El grupo control presentó un porcentaje de área de $13,5 \pm 1,5$, el grupo VPA + VE ($16 \pm 2,2$) y el grupo VE ($16,5 \pm 2,6$) demostraron diferencias significativas al compararlos con el grupo VPA ($7,35 \pm 1,8$).

En el caso de la intensidad de inmunotinción expresado en la notocorda, esta se comportó de forma similar a lo demostrado en la comparación de los grupos en la placa del piso (Fig. 3). El grupo que presentó mayor DOI fue el control ($0,46 \pm 0,015$), y el que menor intensidad mostró fue el VPA ($0,33 \pm 0,014$), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,0001$). Los grupos VPA + VE y VE presentaron valores DOI de $0,43 \pm 0,008$ y $0,46 \pm 0,011$, respectivamente, arrojando diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el grupo VPA. Entre los grupos control, VPA + VE y VE no se encontró significancia estadística.

Los grupos control, VPA, VPA + VE y VE no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de área de la marca inmunohistoquímica a nivel de la notocorda.

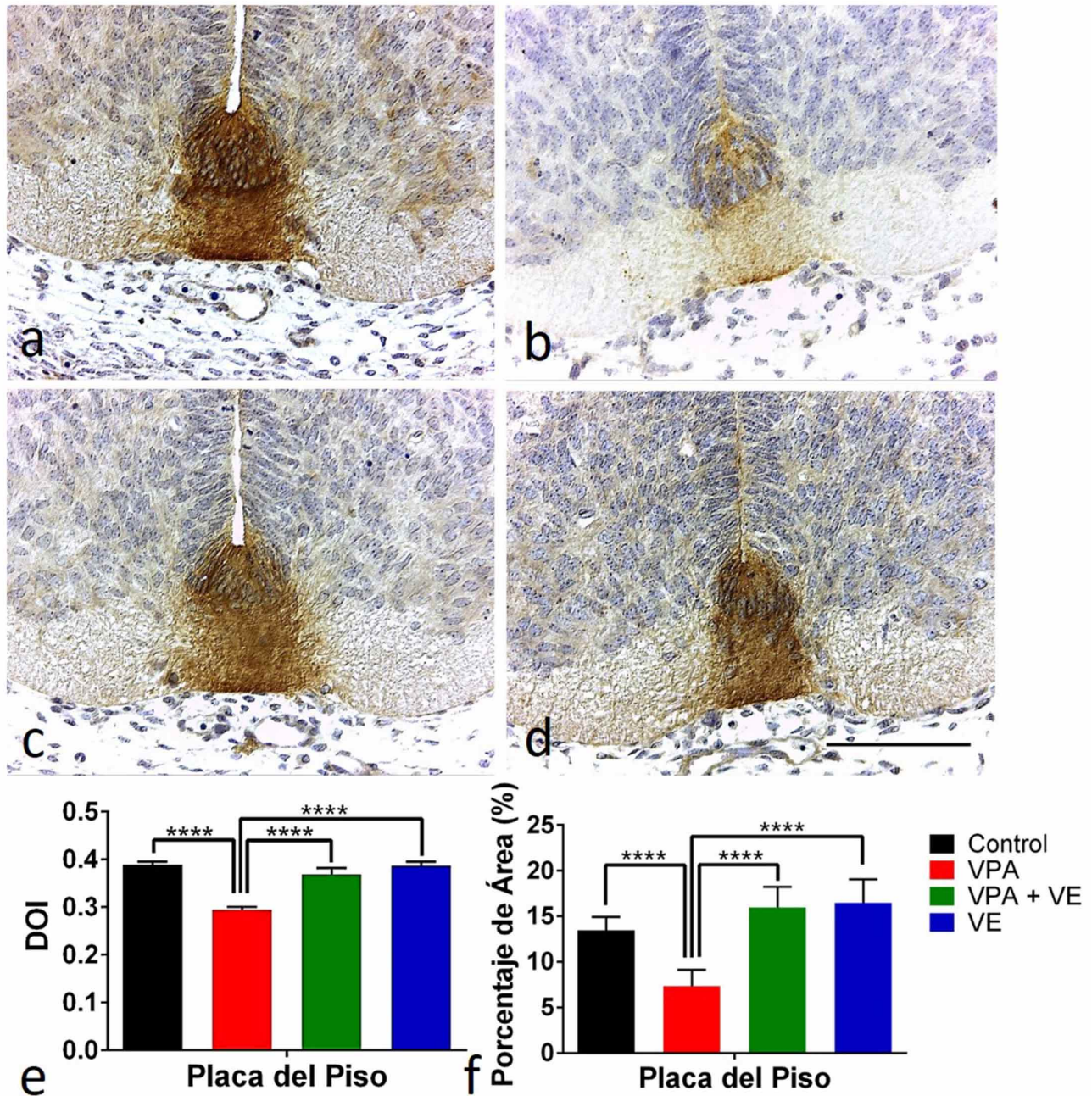


Fig. 2. Placa del piso del tubo neural de embriones de 12 días p.c. a. Grupo 1 (Control). b. Grupo 2 (VPA). c. Grupo 3 (VPA + VE). d. Grupo 4 (VE). Anticuerpo anti-SHH. 400X. Barra 100 μ m. e. Gráfico comparativo de la densidad óptica integrada (DOI) en la placa del piso del tubo neural. f. Gráfico comparativo del porcentaje de área (%) en la placa del piso del tubo neural. **** Valor de $p \leq 0,0001$.

DISCUSIÓN

Se confirmó la hipótesis que la VE tiene un efecto en la expresión de SHH en la placa del piso del tubo neural y notocorda de embriones de ratón tratados con VPA.

En relación al anticuerpo anti-SHH, se observó marcación positiva en la notocorda y en la placa del piso del tubo neural en los embriones de 12 días p.c., lo cual se rela-

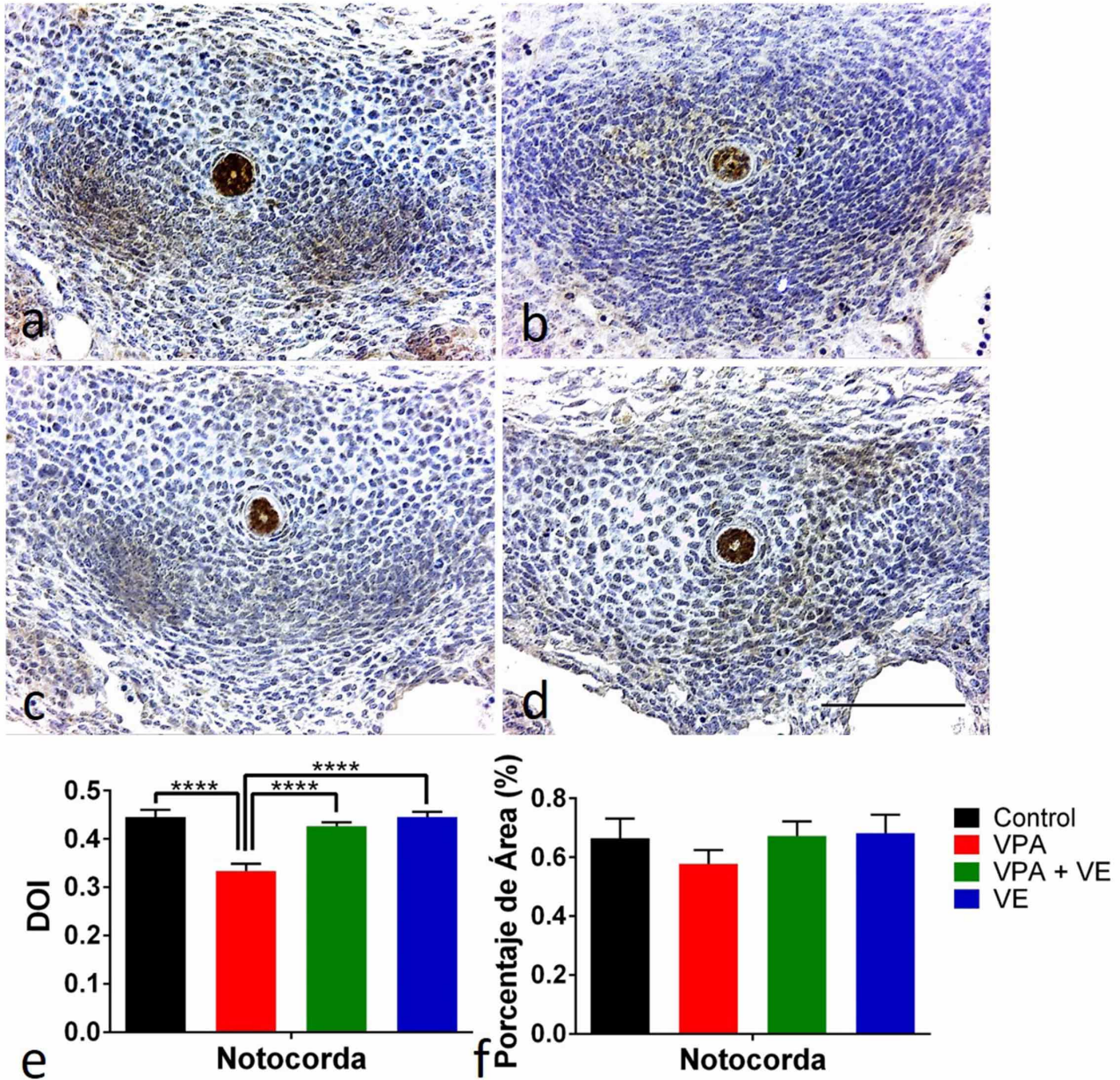


Fig. 3. Notocorda de embriones de 12 días p.c. a. Grupo 1 (Control). b. Grupo 2 (VPA). c. Grupo 3 (VPA + VE). d. Grupo 4 (VE). Anticuerpo anti-SHH. 400X. Scale bar 100 μ m. e. Gráfico comparativo de la densidad óptica integrada (DOI) en la notocorda. f. Gráfico comparativo del porcentaje de área (%) en la notocorda. **** Valor de $p \leq 0,0001$.

ciona con la expresión de moléculas de señalización que son inductoras de la diferenciación de neuronas motoras e interneuronas del tubo neural. Este morfógeno forma un gradiente desde la fuente donde es producida y puede gatillar o atenuar la expresión de diferentes genes y al haber alteraciones en su expresión, se explicarían las malformaciones que induce el VPA en dicho órgano (Chang, 2003; Rojas *et al.*).

El grupo 2 (VPA) presentó una menor intensidad y porcentaje de área de inmunotinción en comparación a los otros grupos, tanto en la placa del piso como en la notocorda. Esto está de acuerdo con las observaciones de Cohen *et al.* sobre interpretación de morfógenos y Oyabu *et al.*, quienes estudiaron la diferenciación inicial de neuronas serotoninérgicas (Cohen *et al.*; Oyabu *et al.*). Incluso, en un estudio en esta misma población celular, se añadió

exógenamente SHH a células neuronales progenitoras tratadas previamente con VPA, lo cual impidió parcialmente el retraso en su maduración (Miyazaki *et al.*, 2005). Sumado a esto, se ha podido observar tanto en modelos animales como en embriones humanos que al haber una expresión reducida de SHH puede ocasionar defectos en el tubo neural, tales como holoprosencefalia, meningocele, mielomeningocele, espina bífida y anencefalia (Tsurubuchi *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2015).

Todos los grupos de 17 días p.c. resultaron inmunonegativos, sin encontrarse diferencias entre ellos. Esto se explica ya que SHH actúa como morfógeno durante el periodo embrionario en el proceso de neurogénesis, principalmente (Rojas *et al.*).

En el caso de la VE, se pudo constatar que ninguno de los embriones o fetos tratados con este fármaco presentó diferencias significativas en la expresión de SHH en placa del piso y notocorda al compararlo con los grupos control y

VPA + VE a los 12 días p.c. Por lo tanto, es posible aseverar que la administración de VE no produce defectos en las crías. Igualmente, se puede afirmar que los embriones que fueron tratados con VPA y VE en forma conjunta presentaron histología normal en comparación al grupo tratado con VPA solo.

Un aporte de esta investigación fue la técnica inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-SHH que resultó muy específica. Hasta el momento, la mayoría de estudios se realizaban con inmunofluorescencia que requiere de criostato. En cambio, la presente técnica se realizó en paraplást y requirió sólo los instrumentos para técnica histológica, por lo que la hace más factible su reproductividad.

En conclusión, los efectos de la VE en el tubo neural de embriones de ratón tratados con VPA, tienen un rol protector sobre los efectos adversos que ocasiona el anticonvulsivante.

CONEI, V. D.; SOLER, G. B.; SAINT-PIERRE, C. G. & ROJAS, R. M. Role of vitamin E in neural tube of mouse (*Mus musculus*) embryos and fetuses treated with valproic acid: Immunohistochemical study of Sonic hedgehog. *Int. J. Morphol.*, 34(3):1044-1050, 2016.

SUMMARY: Sonic hedgehog (SHH) is an essential morphogen for the development of neural tube, members and somites. Variations in expression can cause abnormalities in the nervous system. This will produce teratogens, such as valproic acid (VPA), which increases the reactive oxygen species and can be counteracted with the administration of vitamin E (VE). We sought to determine the expression of SHH in the neural tube and spinal cord in mice embryos and fetuses exposed to VPA, VPA + VE and VE. For the study we used 8 groups of female mice (*Mus musculus*). At day 8 post-coitus (p.c.) the groups were administered as follows: groups 1 and 5, 0.3ml saline; groups 2 and 6, VPA 600 mg/kg; groups 3 and 7, VPA 600 mg / kg + VE 200 IU/kg; groups 4 and 8, VE 200 IU/kg, all treatments were given orally. On the 12th day p.c., groups 1, 2, 3 and 4 were euthanized and the remaining groups at day 17. They were fixed in Bouin solution and included in paraplást; thoracic cross sections were performed, anti-SHH polyclonal antibody (Santa Cruz, H-160, rabbit) dilution 1:100 was used. We described morphology of the positively labeled samples and measured integrated optic density and percentage of immunoreactive area. SHH expression was immunopositive in notochord and floor plate of the neural tube in embryos only 12 day p.c. In the groups treated with VPA + VE and VE immunohistochemistry showed greater intensity and percentage of immunoreactive area compared to those in the group treated with VPA ($p \leq 0.0001$) in the floor plate, being similar to the control group. In the notochord, immunoreaction intensity was similar to that shown in the floor plate, with significant differences ($p \leq 0.0001$), but the percentage of area showed no differences. The groups at day 17 of gestation were negative for the expression of SHH. VE regulates expression of SHH in neural tube, thus attenuating the effects of VPA.

KEY WORDS: Sonic hedgehog; Valproic acid; Vitamin E; Morphogen; Neural tube.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Deeb, S.; Al Moutaery, K.; Arshaduddin, M. & Tariq, M. Vitamin E decreases valproic acid induced neural tube defects in mice. *Neurosci. Lett.*, 292(3):179-82, 2000.
- Chang, T. I.; Horal, M.; Jain, S. K.; Wang, F.; Patel, R. & Loeken, M. R. Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia*, 46(4):538-45, 2003.
- Cohen, M.; Briscoe, J. & Blassberg, R. Morphogen interpretation: the transcriptional logic of neural tube patterning. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 23(4):423-8, 2013.
- Lu, X. L.; Wang, L.; Chang, S. Y.; Shangguan, S. F.; Wang, Z.; Wu, L. H.; Zou, J. Z.; Xiao, P.; Li, R.; Bao, Y. H.; Qiu, Z. Y. & Zhang, T. Sonic Hedgehog Signaling Affected by Promoter Hypermethylation Induces Aberrant Gli2 Expression in Spina Bifida. *Mol. Neurobiol.*, 53(8):5413-24, 2015.

Miyazaki, K.; Narita, N. & Narita, M. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 23(2-3):287-97, 2005.

Niki, E. Evidence for beneficial effects of vitamin E. *Korean J. Intern. Med.*, 30(5):571-9, 2015.

Ornoy, A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod. Toxicol.*, 28(1):1-10, 2009.

Oyabu, A.; Narita, M. & Tashiro, Y. The effects of prenatal exposure to valproic acid on the initial development of serotonergic neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 31(3):202-8, 2013.

Patterson, V. L.; Damrau, C.; Paudyal, A.; Reeve, B.; Grimes, D. T.; Stewart, M. E.; Williams, D. J.; Siggers, P.; Greenfield, A. & Murdoch, J. N. Mouse hitchhiker mutants have spina bifida, dorso-ventral patterning defects and polydactyly: identification of Tulp3 as a novel negative regulator of the Sonic hedgehog pathway. *Hum. Mol. Genet.*, 18(10):1719-39, 2009.

Rimkus, T. K.; Carpenter, R. L.; Qasem, S.; Chan, M. & Lo, H. W. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: Review of smoothened and gli inhibitors. *Cancers (Basel)*, 8(2)pii:E22, 2016.

Rojas, M.; Signore, I. A. & Mejías, R. Morphogens during embryonic development of vertebrates. *Int. J. Morphol.*, 32(1):319-26, 2014.

Sheeba, C. J.; Andrade, R. P. & Palmeirim, I. Mechanisms of vertebrate embryo segmentation: Common themes in trunk and limb development. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 49:125-34, 2016.

Tabata, T. & Takei, Y. Morphogens, their identification and regulation. *Development*, 131(4):703-12, 2004.

Therond, P. Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Ann. Pharm. Fr.*, 64(6):383-9, 2006.

Tsurubuchi, T.; Ichi, S.; Shim, K. W.; Norkett, W.; Allender, E.; Mania-Farnell, B.; Tomita, T.; McLone, D. G.; Ginsberg, N. & Mayanil, C. S. Amniotic fluid and serum biomarkers from women with neural tube defect-affected pregnancies: a case study for myelomeningocele and anencephaly: clinical article. *J. Neurosurg. Pediatr.*, 12(4):380-9, 2013.

Verrotti, A.; Scardapane, A.; Franzoni, E.; Manco, R. & Chiarelli, F. Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid. *Epilepsy Res.*, 78(2-3):171-7, 2008.

Wu, M.; Khan, I. A. & Dasmahapatra, A. K. Valproate-induced teratogenesis in Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 155(3):528-37, 2012.

Dirección para correspondencia:

Dra. Mariana Rojas R.

Laboratorio de Embriología Comparada

Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo

Facultad de Medicina, ICBM

Universidad de Chile

Santiago

CHILE

Email: dramrojas@hotmail.com

mrojasr@u.uchile.cl

Recibido: 18-05-2016

Aceptado: 22-07-2016