

Efecto del extracto atomizado de *Lepidium meyenii* (Maca Negra) en la Memoria Espacial Visual en ratones orquidectomizados

Diana Alcántara Zapata¹, Julio Rubio Marquina¹, Sandra Yucra Sevillano¹,
Vilma Tapia Aguirre¹, Gustavo Gonzales Rengifo¹

Resumen

Objetivo: Evaluar el efecto del Extracto de Maca Negra en la Memoria Espacial Visual (MEV) en ratones machos orquidectomizados.

Material y Métodos: Se utilizaron 61 ratones machos de la cepa Swiss de 3 meses de edad, de los cuales 25 ratones fueron sometidos a orquidectomía. El tratamiento duró 55 días, en el que se administró extracto atomizado de *Lepidium meyenii* (Maca negra). La dosis fue equivalente a 1g de hipocótilo seco/kg de peso corporal. La prueba de nado de Morris se aplicó desde el día 50 hasta el día 55 (5 días).

Resultados: El peso corporal del grupo de ratones castrados y tratados con el extracto atomizado de Maca Negra (CTX-MN) disminuyó significativamente al final del tratamiento ($p<0.05$) con respecto al grupo control (CTX-MN). En la prueba de Nado de Morris, el tiempo de Latencia de Escape disminuyó en los ratones orquidectomizados y tratados con el extracto atomizado de Maca Negra (CTX-MN) con respecto al grupo control (CTX) en el quinto día de prueba ($p<0.05$).

Conclusiones: El extracto atomizado de Maca Negra mejora la Memoria Espacial Visual (MEV) disminuyendo el tiempo de Latencia de escape en la prueba de nado de Morris en ratones deficientes de andrógenos.

Palabras clave: *Lepidium meyenii*, Maca Negra, Memoria Espacial Visual, Morris maze, Castración.

Abstract

Objective: To evaluate the effect of atomized extract of Black Maca in the Visual Spatial Memory (VSM) using the Morris maze test, in orquidectomized male mice.

Methods: 61 male mice of three months from Swiss strain, which 25 male mice were castrated, were used for this study. Mice were orally treated with 1 g atomized Black Maca per kg body weight during 55 days. Memory and learning were assessed using the water Morris maze from 50 to 55 day.

Results: Body weight of group that it was castrated and treaded with Black Maca (CTX-BM) was lesser to end than the beginning the experiment ($p<0.05$). Also, Black Maca (CTX-BM) showed a reduction in escape latency time than CTX-Control mice ($p<0.05$) after 5 days of trials.

Conclusions: The results show that atomized extract of Black Maca enhances Visual Spatial Memory (MEV) reducing latency of escape time.

Key words: *Lepidium meyenii*, Black Maca, Morris Maze, Visual Spatial Memory, Castration.

Introducción

El aprendizaje y la memoria son procesos fundamentales en el desarrollo humano; por lo tanto el mantenimiento de los elementos neurales en los sistemas cerebrales que soportan estos procesos son críticos en la etapa de envejecimiento (6).

La Memoria espacial Visual (MEV) es un tipo de cognición dependiente de hormonas gonadales (3,14, 23). Este tipo de cognición requiere el uso de señales visuales (24). Además, en estudios experimentales se ha demostrado que ratas machos adquieren un desenvolvimiento mejor que las hembras (24).

1 Laboratorio de Endocrinología y Reproducción. Facultad de Ciencias y Filosofía "Alberto Cazorla Talleri". Universidad Peruana Cayetano Heredia Lima – Perú.

En modelos animales con roedores y primates, se ha visto que la privación de andrógenos causa importante pérdida de sinapsis en el hipocampo, causando cambios en la neurotransmisión de la corteza prefrontal (9), y en humanos, están relacionados con procesos nemotécnicos (13); debido a que los andrógenos actúan en estas áreas produciendo efectos en los receptores de catecolaminas, GABA, y serotonina (13). Adicionalmente, se sabe que la conversión *in situ* de testosterona a estradiol por la enzima aromatasa puede influir en el desarrollo de la memoria espacial visual en ratas machos (24). Por lo tanto los receptores de estrógeno estarían involucrados también en este proceso (21).

De otro lado, se ha visto que la terapia de reemplazo hormonal mejora el déficit de andrógenos en hombres en edad avanzada (3; 6). Sin embargo los costos de esta terapia podrían limitar su uso. Por esa razón, las alternativas terapéuticas están cobrando, en la actualidad, mayor importancia (16; 18); incrementándose los estudios en plantas que contienen compuestos como los fitoestrógenos, que pueden revertir los efectos del envejecimiento, mejorando la memoria y el aprendizaje (16,18). Un claro ejemplo de ello es *Lepidium meyenii* (Maca) en su cultivar negro, cuyas propiedades, además de incrementar la fertilidad (1; 8, 9; 31), mejora el déficit de memoria inducido por escopolamina en ratones (29), mejora la Latencia de Aprendizaje y disminuye el Stress en ratonas ovariectomizadas (OVX) (30).

Por tal motivo el objetivo de la investigación es evaluar el efecto del extracto atomizado de *Lepidium meyenii* (Maca Negra) en la Memoria Espacial Visual en ratones machos con deficiencia de Testosterona producido por orquidectomía.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron 61 ratones machos de dos meses y medio de edad, de la cepa Swiss, cuyos pesos fluctuaban entre 30g y 34g que fueron obtenidos del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI 0000056661) y mantenidos en un medio con 12 h luz/12 h oscuridad, temperatura de 22°C ± 2°C; alimentación balanceada y agua ad libitum. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a lo aceptado y aprobado por el Comité de Ética en animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, basado en normas internacionales.

Los grupos evaluados fueron: (1) Sin Operar (n=9); (2) Seudo operados sin tratamiento (Sham) (n=10); (3) Sham tratados con Maca Negra (Sham MN) (n=17); (4) Castrados sin tratamiento (Control-CTX) (n = 14); (5) CTX tratados con Maca Negra (CTX-MN) (n = 11).

Preparación del Extracto Atomizado de Maca Negra (MN)

Los hipocótilos fueron obtenidos en la ciudad de Ninacaca - Pasco – Perú a 4140 m de altitud, y conservado a 0 °C. No se utilizó pesticidas para su crecimiento y producción. El secado se realizó bajo corriente de aire en la misma ciudad de Ninacaca (sin exposición al sol y bajo sombra).

Se utilizaron 500g de hipocótilos secos y pulverizados realizándose posteriormente una extracción etanólica con alcohol etílico al 70% durante 72 horas y luego fueron atomizados por un proceso convencional. Posteriormente se conservó en refrigeración a - 4 °C.

Tratamiento

El tratamiento se realizó durante 55 días. Se administró el extracto y el vehículo (agua destilada) con una sonda oro-gástrica N° 18 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania).

La dosis fue el equivalente de 1g de hipocótilo seco de MN/Kg de peso corporal administrado en un volumen total de 0.5 ml diariamente, similar a un estudio realizado por Rubio (2006).

El grupo control recibió agua destilada. El tratamiento con MN o agua destilada se inició 2 semanas después de la orquidectomía.

Castración – Orquidectomía

En el estudio se realizó orquidectomía a 25 ratones para producir los efectos pato fisiológicos andropausicos (12, 14). Los ratones fueron anestesiados con una dosis de 40 mg/Kg de Halatal (vía intraperitoneal) y 0.5 ml de Lidocaína (vía subcutánea). Una vez anestesiado el animal se procedió a hacer una incisión en la parte inferior ventral extrayendo los testículos (sin epidídimo), previa sutura de la arteria. Se cosió el músculo, la capa subcutánea y luego la piel. En el grupo Sham sólo se realizó una incisión que inmediatamente fue cerrada. Se limpió la zona de la cirugía con alcohol yodado y se aplicó una crema antibiótica. Se dejó recuperar al animal durante 24 horas antes de ser colocado en su respectiva jaula.

Prueba de Nado de Morris

Esta prueba fue adaptada para ratones del paradigma original (26). Se realizó en una piscina circular de color negro (65 cm de diámetro, 45 cm de alto) llena de agua ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) cubriendo, por encima de 1 cm, a una plataforma de escape (6 cm de diámetro y 24 cm de alto). La piscina fue dividida en 4 cuadrantes imaginarios y en uno de los cuadrantes se colocó permanentemente la plataforma de escape. Para oscurecer el agua se le agregó colorante vegetal azul (Colorante inocuo Elyazan S. A. Autorización sanitaria S25013N NAEYSA DIGESA R. I. 15-225-49-G.).

Se realizaron tres pruebas por día durante 5 días consecutivos. Cada prueba se inició colocando al animal en el agua mirando la pared de la piscina, en cualquiera de los puntos de inicio, los cuales eran distintos en cada entrenamiento. Para cada animal se determinó la latencia de escape, la cual se define como tiempo en que el ratón alcanza la plataforma de escape. Si el animal no llegaba a la plataforma dentro de 120 segundos, era colocado sobre la plataforma por 15 segundos. El intervalo entre cada ensayo para el mismo ratón fue de 5 a 10 minutos.

Análisis estadístico

El análisis se realizó utilizando el programa estadístico SPSS (versión12). Los resultados son mostrados como la media \pm error estándar. Las variables fueron analizadas utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de un factor ó la Prueba T-student. En general, valores de $p < 0.05$, fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Peso corporal en animales orquidectomizados tratados con maca negra

Tabla 1: Efecto de la Maca Negra en el Peso corporal. Peso corporal antes y después del experimento. Los datos fueron expresados en gramos (Media \pm ES).

Grupo	Peso Inicial	Peso Final
Sin Operar	31.11 \pm 1.36	32.44 \pm 1.03
Sham	30.63 \pm 0.70	32.84 \pm 0.59*
Sham MN	34.12 \pm 0.67 ^a	32.88 \pm 0.65
Control - CTX	30.71 \pm 0.4 ^b	30.79 \pm 0.68
CTX MN	34.27 \pm 0.52 ^{a,c}	32.64 \pm 0.74*

* $p < 0.05$ con respecto al peso inicial;

^a $p < 0.05$ con respecto al grupo de ratones Sham;

^b $p < 0.05$ con respecto al grupo Sham-MN;

^c $p < 0.05$ con respecto al grupo Control CTX.

Al inicio del tratamiento, los animales del grupo Sham y CTX mostraron un menor peso corporal que los grupos de ratones Sham y CTX tratados con maca negra ($p < 0.05$). Al finalizar los tratamientos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de experimentación ($p > 0.05$).

Al analizar la diferencia del peso final e inicial, se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el delta del peso ($p > 0.05$) mostrándose así que no hubo ni disminución ni aumento en el peso de los animales.

Prueba de nado de Morris

La figura 1 muestra el efecto de la maca negra sobre la latencia de escape durante la prueba de nado de Morris como indicador de la memoria espacial visual en ratones orquidectomizados.

La prueba de ANOVA de dos vías revela un efecto independiente del tratamiento ($F_{4,301} = 9.856$, $p < 0.001$) como del número de días de entrenamiento ($F_{4,301} = 42.887$, $p < 0.001$) más no se observó la influencia de la interacción de ambas variables ($F_{16,301} = 1.310$, $p = 0.190$).

Al día 1 de la prueba de nado de Morris, la prueba ANOVA de una vía no reveló ninguna diferencias significativa entre los grupos de tratamiento ($F_{4,60} = 0.607$, $p = 0.660$). Al día 2, los ratones CTX mostraron una mayor latencia de escape en comparación a los grupos de ratones Sin operar ($p < 0.01$) y Sham ($p < 0.05$). No hubo diferencias significativas entre los grupos control (Sin operar y Sham) y aquellos CTX tratados con maca negra ($p > 0.05$). Al día 3 de entrenamiento, el tiempo para alcanzar la plataforma de escape en los ratones CTX fue significativamente mayor que los tiempos observados en los grupos Sin operar ($p < 0.01$), Sham ($p < 0.001$) y CTX tratados con maca negra ($p < 0.001$). No hubo diferencias significativas

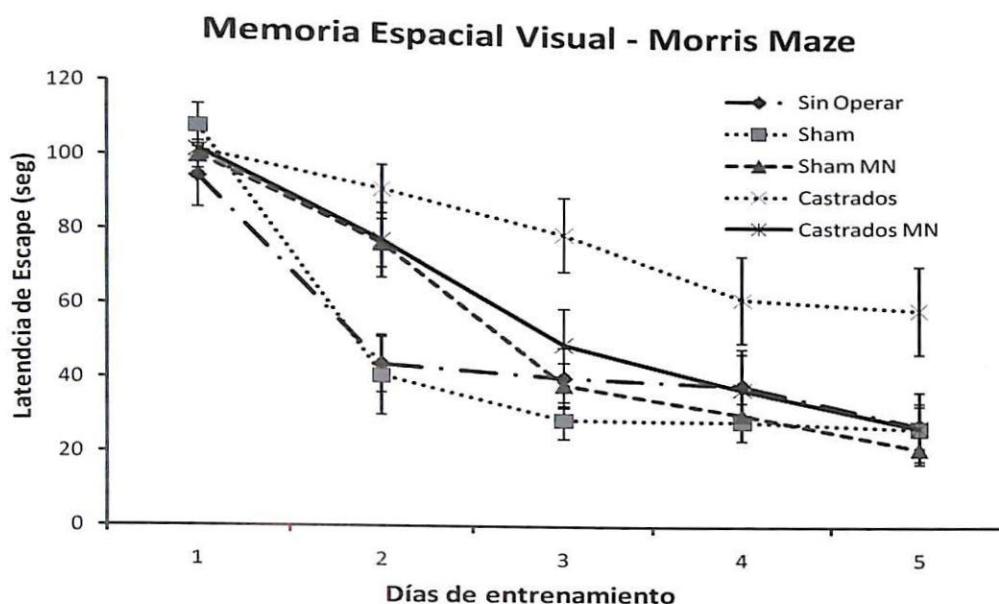


Figura 1: Efecto de la Maca Negra en Latencia de Escape medida durante los cinco días de entrenamiento en la prueba de nado de Morris. Los datos fueron expresados en tiempo en segundos (Media ± ES; tres pruebas por día).

cuando se compararon los ratones de los grupos control y los ratones CTX tratados con maca negra ($p > 0.05$). El mismo comportamiento se observó durante los días 4 y 5 de entrenamiento durante la prueba de nado de Morris donde los ratones CTX mostraron una mayor latencia de escape que los grupos de ratones Sin operar (día 4: $p < 0.05$; día 5: $p < 0.02$), Sham (día 4: $p < 0.005$; día 5: $p < 0.05$), y aquellos ratones CTX tratados con maca negra (día 4: $p < 0.05$; día 5: $p < 0.01$).

Discusión

El presente estudio ha querido resaltar la importancia de los andrógenos, particularmente en la función cognitiva, y el efecto de *Lepidium meyenii* (maca negra) en la memoria en ratones deficientes de andrógenos como una alternativa en la terapia de reemplazo hormonal. El modelo utilizado fue la orquideectomía, ya que se sabe que este procedimiento afecta la Memoria Espacial Visual deteriorándose la retención (26, 28) debido a la caída de andrógenos (7; 24; 29). Esta caída, produce pérdida de sinapsis en el hipocampo, causando cambios en la neurotransmisión de la corteza prefrontal (6; 14; 18), déficit progresivo de la memoria y aprendizaje, degeneración del sistema nervioso central colinérgico y monoaminérgico, excesivo estrés oxidativo en el cerebro y el desbalance entre diferenciación y apoptosis. (12; 15; 17; 23; 26)

En este experimento, el modelo de castración funcionó como grupo Control similar a los resultados que se obtuvieron en estudios anteriores (28; 29; 30). Los ratones orquidectomizados tuvieron un tiempo de latencia de escape mayor con respecto a los demás grupos después de cinco días de entrenamiento debido a que no presentaban una producción normal de andrógenos, y es conocido que estas hormonas después de convertirse *in situ* a estradiol por la enzima aromatasa (13; 15), se unen a receptores específicos en el hipocampo, que están estrechamente ligados a las capacidades de memoria y aprendizaje (19; 37). Por lo tanto, los estrógenos afectan áreas del cerebro que no están involucradas principalmente en la reproducción (19). El 80 % de estradiol circulante en machos no se origina de los testículos, si no de la aromatización de la testosterona que ocurre en la periferia o áreas cerebrales relacionadas a la memoria visual como la corteza frontal y el hipocampo (2; 13; 23).

Se sabe que la terapia de reemplazo hormonal mejora el déficit de andrógenos en hombres en edad avanzada (3; 6; 13), y que los estrógenos exógenos revierten este efecto mejorando significativamente la Memoria Visual (3), ya que son mediados por la expresión diferencial de α -receptores de estrógenos versus los β -receptores de estrógenos en estructuras cerebrales que activan o inhiben los mecanismos de muerte celular (19).

La medicina natural está incrementando en la actualidad como un tratamiento alternativo

ya que, de acuerdo con la literatura, existen plantas con actividad estrogénica que además presentan compuestos fitoquímicos denominados fitoestrógenos, que mejoran la memoria y el aprendizaje (37).

Los fitoestrógenos son moléculas presentes en muchas plantas que son estructuralmente y funcionalmente similares al estradiol (con una estructura difenólica no esteroidea) y tienen la capacidad de unirse selectivamente a los receptores de estrógenos (21).

Lepidium meyenii presenta compuestos fitoquímicos como glucosinolatos y polifenoles (10;20); así como también ácidos grasos saturados e insaturados, saponinas y fitoestrógenos (10). Estos últimos pueden revertir los efectos del envejecimiento y potenciar funciones cognitivas (21; 24). Estos fitoestrógenos son esteroides como el betasitosterol, el campesterol, y el estigmasterol (10). Todos ellos llevan como base la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno, común a las hormonas esteroideas (2). Por lo tanto el consumo de Maca estaría relacionado con la ingesta de compuestos activos similares a los estrógenos.

La Maca no afecta los niveles séricos de estradiol en ratas macho después de 42 días de tratamiento (10; 34). Por lo tanto los resultados sugieren que ciertos metabolitos de Maca Negra podrían estar actuando como moduladores en los receptores beta estrogénicos, en áreas cerebrales involucradas con la memoria, como en estudios anteriores (16,37). Algunos autores soportan esta idea debido al contenido de triterpenos esteroideos presentes en la Maca (7; 10; 11), ya que estos compuestos no ejercen una actividad androgénica directa puesto que no pueden regular el elemento respuesta a glucocorticoides (GRE). (4; 10).

No se sabe con exactitud el mecanismo de acción de los metabolitos de la Maca Negra en la memoria y el aprendizaje. Sin embargo se ha demostrado que mejora la memoria Espacial Visual disminuyendo el tiempo de Latencia de escape en la prueba de nado de Morris, revirtiendo el efecto de la castración.

No se descarta la posibilidad de que los esteroides gonadales u otras sustancias producidas por los testículos puedan tener alguna influencia adicional. Es necesario realizar investigaciones a nivel molecular en zonas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria; además de la evaluación del efecto de diferentes tipos de extractos de Maca Negra en la memoria y aprendizaje, para identificar los metabolitos específicos y los posibles mecanismos de acción que estarían involucrados

en los procesos de memoria y el aprendizaje.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

Referencias

- Apumayta U, Lock O. La Maca, importante especie vegetal peruviana merece un mayor estudio. Revista de Química PUCP. 1993; 7:214-16.
- Becker, K. Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Lippincott, Philadelphia. 1995.
- Beer Tm, Bland Lb, Bussiere Jr, Neiss Mb, Wersinger Em, Garzotto M, Ryan Cw, Janowsky Js. Testosterone loss and estradiol administration modify memory in men J. Urol 2006; 175:130 - 5
- Bogani P, Simonini F, Iriti M, Rossoni M, Faoro F, Poletti A, Vissoli F. *Lepidium meyenii* (Maca) does not exert direct androgenic activities. J Ethnopharmacol. 2006; 104(3):415-7.
- Chacon RG. Estudio Fitoquímico de *Lepidium meyenii* Walp. Tesis de Bachiller de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 1961. pag. 46
- Driscoll I, Hamilton DA, Petropoulos H, Yeo RA, Brooks WM, Baumgartner RN, Sutherlan RJ. The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. Cereb Cortex, 2003; 13: 1344-51.
- Gonzales GF, Rubio J, Chung A, Gasco M, Villegas L. Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function in male rats. Andrology. 2003; 5:349-52.
- Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, y col. Red Maca (*Lepidium meyenii*) Reduced prostate size in rats. Reproductive Biology and Endocrinology. 2005. 20, 3-5.
- Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in rats. J Ethnopharmacol. 2006a; 103:448–454.
- Gonzales GF. Maca de la Tradición a la Ciencia. Lima: CONCYTEC. 2006b
- Gonzales GF. Biological effects of *Lepidium meyenii*, Maca, a plant from the highlands of Peru. In: Singh VK, Bhardwaj R, Govil JN, Sharma RK., editor. Natural Products: in Recent Progress in Medicinal Plants. USA. Studium Press LLC. 2006c p. 217
- Gulinello M, Lebesgue D, Jover-Mengual T, Zukin RS, Etgen AM. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. Hormones and behavior. 2006; 49:246-60.
- Janowsky JS. The role of androgens in cognition and brain aging in men. Neuroscience 2006; 138:1015-20
- Johnson RT, Burk JA. Effects of gonadectomy and androgen supplementation on attention in male rats. Neurobiol Learn Mem. 2006, 85 219-27
- Jones BA, Watson NV. Spatial memory performance in androgen insensitive male rats Physiology & behavior 2005, 85:135-41.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, Tagliaferri G, Bickford PC. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards

- the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci.* 1998; 18:8047-55.
17. JURASKA JM. Sex differences in "cognitive" regions of the rat brain. *Psychoneuroendocrinology.* 1991. 16:105-9.
18. Kishore K, Singh M. Effect of bacosides, alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi), on experimental amnesia in mice. *Indian J Exp Biol.* 2005, 43(7):640-5.
19. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, Van Der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998; 139:4252-63.
20. Lama G, Quispe G, Ramos D, Fereyra C, Casas H, Apumayta V, 1994. Estudio de la propiedad estrogénica de *Lepidium meyenii* en ratas. En: Resúmenes de los trabajos, II congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y bioquímica "Marco Antonio Garrido Malo", 17-21, Octubre de 1994. Lima - Perú. Pag 73.
21. Lee Yoon-Bok, Lee Hyong Joo, Sohn Heon Soo. Soy isoflavones and connective function. *J Nutr Biochem.* 2005; 16:641-9.
22. Li G, Ammermann U, Quiros CF. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacon) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Econ Bot.* 2001; 55:225- 62.
23. Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav.* 1998; 34:149-62.
24. Lund Trent D, West Timothy W, Tian Lilyan Y, Bu Lihong H, Simmons Daniel L, Setchell Kenneth DR, Herman Adlercreutz, Lephart Edwin D. Visual spatial memory is enhanced in female rats (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens *Neuroscience.* 2001; 2: 20.
25. Morgado Bernal I. Psicobiología del aprendizaje y la memoria. Cuadernos de información y comunicación. 2005. Pag 10
26. Morris R. Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984; 11: 47-60.
27. Naftolin F. Brain aromatization of androgens. *J Reprod Med.* 1994. 39,257-61.
28. Roof RL. Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm and Morris water maze performance in prepubescent and adult rats. *Behav Brain Res.* 1993. 53: 1-10.
29. Rubio J, Riqueros Mi, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol.* 2006a; 44: 1114-22.
30. Rubio J, Caldas M, Dávila S, Gasco M, Gonzales GF. Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC Complement Altern Med.* 2006b; 23; 6: 23
31. Rubio J, Qiong W, Liu X, Jiang Z, Dang H, Chen SL, Gonzales GF. Aqueous Extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on Memory Impairment Induced by Ovariectomy in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.*
32. Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, Lu Y, Yan SJ, Qien LC, Zheng QY. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology.* 2000; 55:598-60.

Correspondencia: naniza2003@yahoo.com

Recibido: 27 de mayo de 2011

Aceptado: 23 de agosto de 2011