

# Efecto Angiogénico Comparado del Celecoxib Microencapsulado en PLGA v/s no Encapsulado en un Ensayo *in vivo* de Angiogénesis

Comparative Angiogenic Effect of Microencapsulated Celecoxib in PLGA v/s non-Encapsulated in an *in vivo* Angiogenesis Assay

Ignacio Roa<sup>1</sup>; Ricardo Poblete Cortés<sup>2</sup>; Mario Salinas Sanhueza<sup>2</sup>; Daniel Tobar Ugalde<sup>2</sup>; Alondra Donoso<sup>3</sup> & Carlos Rosas<sup>4</sup>

ROA, I.; POBLETE, C. R.; SALINAS, S. M.; TOBAR, U. D.; DONOSO, A. & ROSAS, C. Efecto angiogénico comparado del celecoxib microencapsulado en plga v/s no encapsulado en un ensayo *in vivo* de angiogénesis. *Int. J. Morphol.*, 40(2):420-424, 2022.

**RESUMEN:** La angiogénesis es el proceso de formación de vasos sanguíneos a partir de otros formados previamente. Existen varios factores que están involucrados en el proceso, así como agentes capaces de modular distintas etapas de esta. Si bien, se ha observado que Celecoxib es capaz de inhibir la angiogénesis en distintos modelos, aún no se ha observado la potencial capacidad antiangiogénica de este agente cuando es microencapsulado en PLGA. Se incubaron huevos fertilizados y a las 48 horas se dividieron en 4 grupos para ser instilados con PBS (control), PLGA, Celecoxib 1000 ppm o Celecoxib 1000 ppm + PLGA. Se realizó un conteo de los vasos sanguíneos a las 48, 72 y 96 horas post aplicación de la solución a estudiar. Los resultados muestran que tanto Celecoxib como Celecoxib+PLGA reducen los vasos sanguíneos, manteniendo el mismo efecto a las 48, 72 y 96 horas y no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos. Esto podría ser explicado por la concentración de Celecoxib usada o el margen de tiempo analizado, pudiendo encontrarse diferencias posteriores a este rango de tiempo o con concentraciones distintas.

**PALABRAS CLAVE:** Angiogénesis; Microencapsulación; Celecoxib; PLGA.

## INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es un proceso fisiológico que induce la formación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Es un proceso activo durante el período embrionario y en la reparación de heridas, presentándose además en patologías como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y el cáncer (Mukwaya *et al.*, 2021).

Los procesos celulares que culminan con el desarrollo de vasos se inician con la degradación de la membrana basal, proliferación de células endoteliales y reclutamiento de células circulantes para la formación de estos vasos. Estas células migran mientras proliferan hacia la zona de inducción de angiogénesis; luego se tubularizan y se restituye la membrana basal para restablecer nuevamente el flujo sanguíneo (Folkman, 1990; Folkman & Shing, 1992).

La angiogénesis se encuentra regulada por una serie de factores como la Familia del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), Angiopoyetinas, Factor de Crecimiento Transformante (TGF), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleukinas y varios miembros de la familia del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) (Carmeliet, 2000), además de muchos otros que controlan e influyen la angiogénesis, incluyendo factores solubles del crecimiento, proteínas relacionadas a membrana, interacciones célula-membrana basal e interacciones célula-célula. Entre otros sistemas de interacción celular, un ejemplo importante son las interacciones Notch, las cuales actúan como un factor supresor del proceso angiogénico (Ziyad & Iruela-Arispe, 2011).

Por otro lado, existe una fuerte relación entre

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Talca, Chile

<sup>2</sup> Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>3</sup> Unidad de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Central de Chile, Coquimbo, Chile.

<sup>4</sup> Escuela de Medicina, Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián, Valdivia, Chile.

angiogénesis e inflamación, siendo unos de los mecanismos moleculares implicados, el de la enzima Ciclooxigenasa 2 (COX-2), la cual se ve sobreexpresada en procesos inflamatorios catalizando el paso de ácido araquidónico presente en membrana de fosfolípidos a especies reactivas de oxígeno. La prostaglandina E2 (PGE2) es un producto metabólico de la reacción de COX-2, y es la PGE2 la que induce la migración celular, mediante la expresión de metaloproteinasas (MMPs) las cuales degradan la matriz extracelular, y la proliferación celular, estimulando la secreción de VEGF y FGF-2 (Santulli, 2013).

Celecoxib (Cx) es un anti-inflamatorio no esterooidal selectivo, el cual es un potente inhibidor de la enzima COX-2, siendo uno de los fármacos ampliamente estudiados por sus propiedades antiangiogénicas. En la actualidad es utilizado como anti-inflamatorio en tratamientos de enfermedades como la artritis reumatoide y osteoartritis. Por sus propiedades antiangiogénicas se ha puesto a prueba su acción sobre tumores malignos ya que se ha demostrado que inhibidores de COX-2 son capaces de reducir la proliferación celular, inducir apoptosis, favorecer la vigilancia inmunológica y reducir la angiogénesis. Esto ha sido objeto de estudio en el tratamiento de diversos tumores malignos y premalignos, incluyendo cáncer de mama, pulmón y próstata (Husain *et al.*, 2002; Hilmi & Goh, 2006).

En estudios recientes de la acción del Cx en tumores TA3-MTX-R en ratones, se evidenció que este fármaco disminuye los síntomas asociados a la presencia del tumor como la metástasis, proliferación celular y la sobreexpresión de factores proangiogénicos. Por otro lado, la apoptosis celular en las células tumorales se vio aumentada, debido presumiblemente a la acción del Cx sobre VEGF (Rosas *et al.*, 2014).

Si bien los efectos del Cx son favorables, su administración oral causaría complicaciones tales como toxicidad sistémica (Bombardier *et al.*, 2000) y problemas gastrointestinales (Silverstein *et al.*, 2000) o daño y eventos cardiovasculares (Caldwell *et al.*, 2006).

La administración convencional de medicamentos, la solubilidad limitada de estos, además de la aplicación de algunos protocolos terapéuticos que requieren la administración de dosis repetidas, resultan ser una problemática constante en la terapéutica. Esta puede ser solucionada mediante la utilización de micropartículas poliméricas, las cuales, mediante métodos de microencapsulación permitirían una liberación sostenida del fármaco en el tiempo, una disminución en el número de dosis necesarias para el tratamiento y la protección de estos hasta el tejido blanco. Entre los biopolímeros utilizados en el desarrollo de sistemas de

micropartículas para la liberación controlada del compuesto destacan los derivados acrílicos y poliésteres. Entre ellos, los más conocidos son la poli-caprolactona, el ácido poliláctico y los copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA) (Vilos & Velasquez, 2011).

Recientes estudios han informado la acción antiangiogénica de Cx en concentraciones de 1000 ppm vía oral frente a un modelo de tumor TA3-MTX-R en ratones. Otros autores han comparado la acción de Cx en las mismas concentraciones, en presentaciones microencapsuladas en PLGA y no encapsuladas, no encontrando diferencias significativas en el número de vasos sanguíneos (Rosas *et al.*, 2013), y que por otro lado, cuando se compara Cx-microencapsulado en PLGA vs Cx no encapsulado en iguales concentraciones inyectada en ratones con la misma cepa de tumor, concluyen, que el número de vasos sanguíneos registrados entre los tratamientos no presentaron diferencias antiangiogénicas estadísticamente significativas (Roa *et al.*, 2015). En base a estos antecedentes el objetivo del presente estudio fue comparar los efectos antiangiogénicos del Cx microencapsulado en PLGA y no microencapsulado en un modelo de membrana alantocoriónica (MAC) de pollo, posterior a 48, 72 y 96 horas de cultivo.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Aplicación de Cx y Cx+PLGA.** Se utilizaron 60 Huevos fertilizados White Leghorn provenientes del Instituto de Salud Pública, Chile. Se procedió al protocolo descrito por Córdova *et al.* (2016). A las 48 horas de incubación se perforó cada huevo y se extrajo aproximadamente 2 mL de albúmina con ayuda de una pipeta Pasteur. Se desinfectó la zona con una solución de alcohol yodado y se tapó con cinta adhesiva. Luego se abrió a nivel dorsal una ventana de 2,5 cm de ancho por 2 cm de alto. Todo este proceso se hizo de manera estéril.

Se distribuyeron los huevos de manera aleatoria en cuatro grupos de 15 unidades cada uno, de la siguiente manera:

- Grupo 1: control (PBS)
- Grupo 2: partículas de PLGA
- Grupo 3: Celecoxib en concentración 1000 ppm
- Grupo 4: Celecoxib microencapsulado en partículas de PLGA en concentración 1000 ppm

A los 8 días de incubación, se implantó en la membrana alantocoriónica (MAC) de cada uno, un filtro de metilcelulosa impregnado con fármacos disueltos en 60 µL de DMSO 0,1 %.

En el transcurso de las 48, 72 o 96 horas post-aplicación de la solución a estudiar, se procedió a estudiar 5 huevos, extrayendo muestras de MAC de cada uno. Las muestras obtenidas fueron fijadas en formalina tamponada pH 7,0 al 10 % por 7 días. Luego se realizó el procesamiento histológico necesario para obtener cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor.

Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el protocolo de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Santiago, Chile (CBA FMUCH #0498).

**Análisis de Densidad Microvascular.** Se determinó la densidad microvascular, entendiéndose ésta como el número total de vasos sanguíneos registrados en un área de 9000  $\mu\text{m}^2$  desde un ocular reticulado y con un aumento de 400x, en MAC de embriones de pollo de 11y 13 días de vida, tratados y no tratados. Se efectuaron conteos en cada uno de los grupos de trabajo, obteniéndose valores del número de capilares sanguíneos a las 48, 72 y 96 horas post aplicación de las sustancias.

**Análisis Estadístico.** Se utilizó el programa Graph Pad Prism® 5 y el análisis estadístico se realizó a través de ANOVA de una vía con Test de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un P-value < 0,05.

**RESULTADOS**

Morfológicamente, las secciones de tejido tratadas con Cx y Cx+PLGA mostraron una morfología normal sin daño aparente.

El análisis de densidad microvascular mostró que el número de vasos / 9000  $\mu\text{m}^2$  en MAC disminuyó significativamente cuando se aplicó Cx y fue evaluado a las 48, 72 o 96 horas (  $p < 0,0001$ ) (Fig. 1).

Al analizar la densidad microvascular del efecto de Cx+PLGA a las 48, 72 y 96 horas, se pudo comprobar una disminución en el número de vasos/9000  $\mu\text{m}^2$ , cuando fue comparado con el grupo control (PLGA) (  $P < 0,05$ ) (Fig. 2).

Finalmente, al analizar cada uno de los grupos de estudio a lo largo del tiempo, se puede observar que el grupo control tratado con PBS es el que posee el promedio de vasos sanguíneos más alto de los 4 grupos de estudio (10,20 $\pm$ 0,18 vasos sanguíneos/9000  $\mu\text{m}^2$ ), seguido por el grupo control tratado con PLGA (8,84 $\pm$ 0,38 vasos sanguíneos/9000  $\mu\text{m}^2$ ). Los grupos tratados con Cx o Cx+PLGA logran reducir significativamente el número de vasos

(8,108 $\pm$ 0,13 y 8,107 $\pm$ 0,12 respectivamente), no existiendo entre ellos una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Fig. 3).

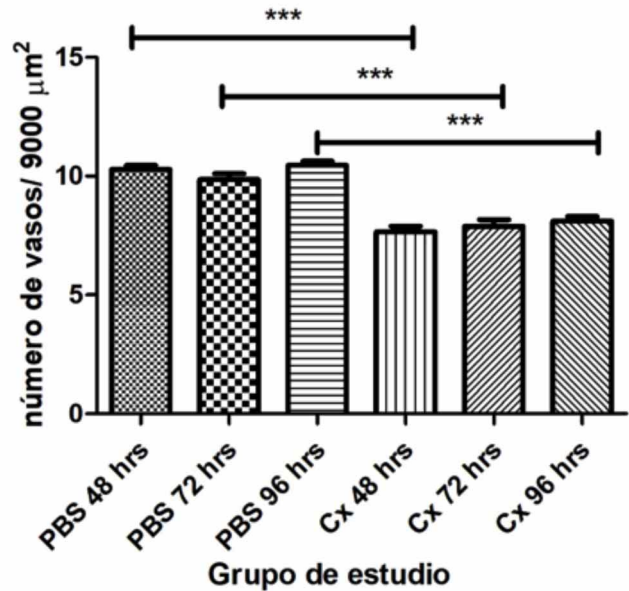


Fig. 1. Cx reduce la densidad microvascular en MAC a las 48, 72 y 96 horas. Datos expresados como número de vasos en 9000  $\mu\text{m}^2$  (\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

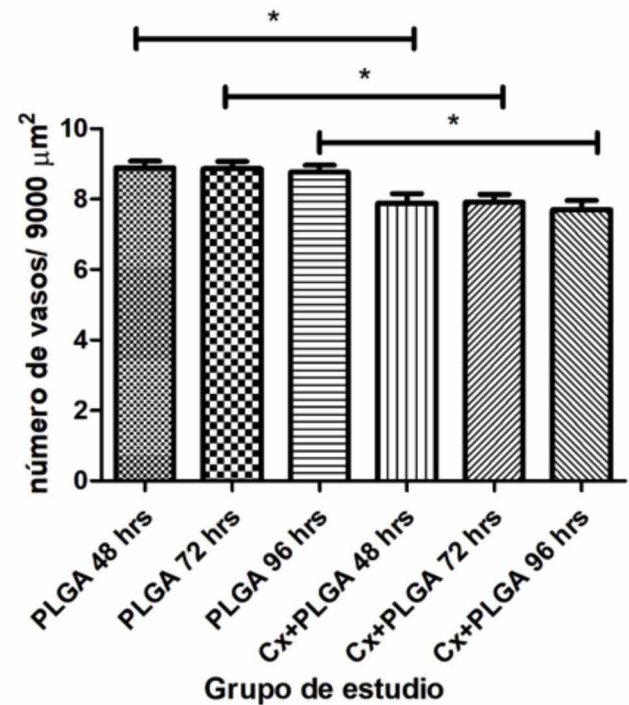


Fig. 2. Cx+PLGA reduce la densidad microvascular en MAC a las 48, 72 y 96 horas. Datos son expresados como número de vasos en 9000  $\mu\text{m}^2$  (\*:  $p < 0,05$ ).

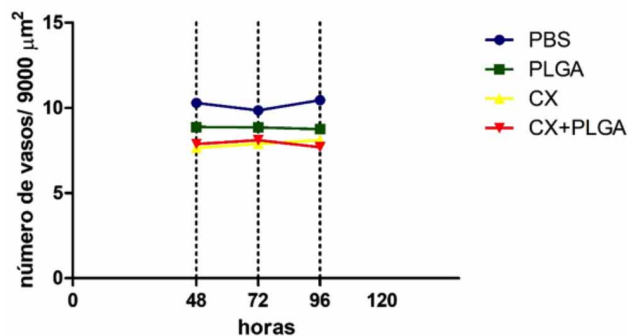


Fig. 3. Cx tiene un efecto antiangiogénico similar a Cx+PLGA. Datos son expresados como número de vasos en 9000  $\mu\text{m}^2$  (ns:  $p>0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La angiogénesis está presente en una serie de patologías, en las cuales se encuentra desregulada, dentro de ellas, los procesos neoplásicos, donde el crecimiento tumoral y la posterior metástasis, dependen de la generación de nuevos vasos, es así como las células tumorales favorecen este proceso, al producir numerosos factores proangiogénicos, como el VEGF (Gavalas *et al.*, 2013). Las terapias antiangiogénicas actuales buscan inhibirlo con el fin de disminuir la neovascularización. VEGF puede ser inhibido por múltiples agentes, entre ellos los inhibidores selectivos de COX-2, tal como Celecoxib (Cx), importante agente anti-inflamatorio (Venkatesan *et al.*, 2011).

En un estudio anterior (Rosas *et al.*, 2014), se llegó a concluir que en un modelo de tumor de células TA3-MTX resistente, el efecto antiangiogénico de Celecoxib era beneficioso para el manejo clínico de la progresión tumoral en pacientes con neoplasias, puesto que éste actúa por una vía diferente al metotrexato, un antifolato que impide la óptima disponibilidad de ácido fólico por parte de las células tumorales, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos. Por otro lado, en un trabajo posterior (Roa *et al.*, 2015), se analizó el efecto diferencial de Celecoxib no encapsulado y microencapsulado en partículas de PLGA, en ratones con la misma variable de tumor TA3-MTX-R, no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre el efecto antiangiogénico de Celecoxib encapsulado y microencapsulado. En tal trabajo se planteó como causa de tales resultados la posible implicancia del metabolismo del ratón, puesto que la intensidad de la angiogénesis puede variar incluso entre individuos con el mismo tipo de tumor (Eberhard *et al.*, 2000), y que en algunos carcinomas, el aumento de la densidad microvascular no es atribuible, al menos exclusivamente, a la secreción de VEGF por las células tumorales (Pérez, 2011).

En el presente trabajo, se administró 1000 ppm de Celecoxib no encapsulado y microencapsulado ahora directamente sobre la membrana alantocoriónica de pollo, donde se ha descrito que la angiogénesis está regulada por las mismas vías dependientes de VEGF (Valdés *et al.*, 2002), esperando ahora hallar diferencias significativas entre Cx y Cx microencapsulado en PLGA.

Respecto a los resultados registrados en los grupos medidos a las 48 horas, se obtuvo una diferencia significativa entre el grupo control (PBS) y Cx no encapsulado, estando esto acorde a lo demostrado en trabajos anteriores, dada la inhibición que ejerce Cx sobre COX-2 (Rosas *et al.*, 2013). A su vez, también se halló una diferencia significativa entre el control (PLGA) y Cx+PLGA, estando esto explicado por el mismo efecto antiangiogénico que ejerce el Cx, y demuestra que Cx microencapsulado sigue ejerciendo una acción antiangiogénica. Por otra parte, no se halló una diferencia significativa en la densidad microvascular obtenida a las 48 horas entre los grupos con Cx y Cx+PLGA. Esto podría ser explicado, a través del hecho que, con dosis más bajas y continuas, se puede lograr un efecto similar.

En cuanto a los grupos medidos a las 72 y 96 horas, se hallaron las mismas diferencias significativas que las registradas a las 48 horas. Cabe destacar que se mantiene la ausencia de diferencia significativa entre Cx+PLGA y Cx, al hecho que la cantidad de Cx necesaria es mucho menor y que en ambos casos se logra un efecto permanente a las 96 horas. Esto no confirma que el efecto se mantenga posterior a las 96 horas y, por lo tanto, es probable que las diferencias se manifiesten posterior a este tiempo y por lo tanto es necesario comprobar rol de PLGA en cuanto a la disponibilidad y liberación del fármaco cuando se administra microencapsulado en comparación a Cx no encapsulado (Roa *et al.*, 2016, 2017).

Por último, en cuanto a la comparación temporal de los mismos grupos entre sí, se pudo observar que todos se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo incluso a las 96 hrs post aplicación, tanto para aquellos que estuvieron recubiertos por PLGA como para aquellos en donde el fármaco fue aplicado libremente. Éste fenómeno podría tener más de una causa, y es que aun cuando la vida media del fármaco es de 11 horas en plasma (Ghosh *et al.*, 2010), la concentración del fármaco es suficiente para entregar un efecto constante a lo largo de los días.

ROA, I.; POBLETE, C. R.; SALINAS, S. M.; TOBAR, U. D.; DONOSO, A. & ROSAS, C. Comparative angiogenic effect of microencapsulated celecoxib in plga v/s non-encapsulated in an *in vivo* angiogenesis assay. *Int. J. Morphol.*, 40(2):420-424, 2022.

**SUMMARY:** Angiogenesis is the process of blood vessel formation from previously formed ones. There are several factors involved in the process, as well as agents capable of modulating different stages of it. Although, it has been observed that Celecoxib is capable of inhibiting angiogenesis in different models, the potential antiangiogenic capacity of this agent has not yet been observed when it is microencapsulated in PLGA. Fertilized eggs were incubated and at 48 hours they were divided into 4 groups to be instilled with PBS (control), PLGA, Celecoxib 1000ppm or Celecoxib 1000 ppm + PLGA. A blood vessel count was performed at 48, 72 and 96 hours after application of the solution to be studied. The results show that both Celecoxib and Celecoxib + PLGA reduce blood vessels, maintaining the same effect at 48, 72 and 96 hours and there are no significant differences between the two treatments. This could be explained by the concentration of Celecoxib used or the time frame analyzed, being able to find differences after this time range or with different concentrations.

**KEY WORDS: Angiogenesis; Microencapsulation; Celecoxib; PLGA.**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bombardier, C.; Laine, L.; Reicin, A.; Shapiro, D.; Burgos-Vargas, R.; Davis, B.; Day, R.; Ferraz, M. B.; Hawkey, C. J.; Hochberg, M. C.; *et al.* Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 343(21):1520-8, 2000.
- Caldwell, B.; Aldington, S.; Weatherall, M.; Shirtcliffe, P. & Beasley, R. Risk of cardiovascular events and celecoxib: a systemic review and meta-analysis. *J. R. Soc. Med.*, 99(3):132-40, 2006.
- Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.*, 6(4):389-95, 2000.
- Córdova, S.; Lemus, D.; Rosas, C. & Calderón, J. Ácido Acetilsalicílico (AAS) inhibe angiogénesis en membrana alantocoriónica de pollo (MAC). *Rev. Chil. Cardiol.*, 35(2):127-32, 2016
- Eberhard, A.; Kahlert, S.; Goede, V.; Hemmerlein, B.; Plate, K. H. & Augustin, H. G. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.*, 60(5):1388-93, 2000.
- Folkman, J. & Shing, Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 267(16):10931-4, 1992.
- Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 82(1):4-6, 1990.
- Gavalas, N. G.; Lontos, M.; Trachana, S. P.; Bagratuni, T.; Arapinis, C.; Liacos, C.; Dimopoulos, M. A. & Bamias, A. Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(8):15885-909, 2013.
- Ghosh, N.; Chaki, R.; Mandal, V. & Mandal, S. C. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological Rec.*, 62(2):233-44, 2010.
- Hilmi, I. & Goh, K. L. Chemoprevention of colorectal cancer with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Chin. J. Dig. Dis.*, 7:1-6, 2006.
- Husain, S. S.; Szabo, I. L. & Tarnawski, A. S. NSAID inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of action. *Am. J. Gastroenterol.*, 97(3):542-53, 2002.
- Mukwaya, A.; Jensen, L. & Lagali, N. Relapse of pathological angiogenesis: functional role of the basement membrane and potential treatment strategies. *Exp. Mol. Med.*, 53:189-201, 2021.
- Pérez, V. L. *VGEF-A y COX-2 en la angiogénesis del carcinoma de mama.* Málaga, Universidad de Málaga, 2011.
- Roa, I.; Cantín, M.; Muñoz, M.; Rosas, C. & Lemus, D. Celecoxib/PLGA suppresses angiogenesis and lung metastasis of murine experimental breast cancer. *Int. J. Morphol.*, 34(1):335-41, 2016.
- Roa, I.; Cantín, M.; Vilos, C.; Rosas, C. & Lemus, D. Angiogenesis and tumor progression inhibition of Cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib associated with poly lactic-co-glycolic acid in tumor cell line resistant to chemotherapy. *Int. J. Morphol.*, 35(2):733-9, 2017.
- Roa, I.; Moraga, J.; Cantín, M.; Rosas, C. & Lemus, D. Antimetastatic effect of Celecoxib/PLGA in a TA3-MTX-R murine breast adenocarcinoma model. *Int. J. Morphol.*, 33(2):558-65, 2015.
- Rosas, C.; Roa, I.; Fuenzalida, M. & Lemus, D. Celecoxib effect in a multiresistant variant of the TA3 tumor. A histological description. *Int. J. Morphol.*, 31(2):392-8, 2013.
- Rosas, C.; Sinning, M.; Ferreira, A.; Fuenzalida, M. & Lemus, D. Celecoxib decreases growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *Biol. Res.*, 47(1):27, 2014
- Santulli, G. *Angiogenesis. Insights from a Systematic Overview.* London, Nova Science Pub. Inc., 2013. pp.247-8.
- Silverstein, F. E.; Faich, G.; Goldstein, J. L.; Simon, L. S.; Pincus, T.; Whelton, A.; Makuch, R.; Eisen, G.; Agrawal, N. M.; Stenson, W. F.; *et al.* Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA*, 284(10):1247-55, 2000.
- Valdés, T. I.; Kreutzer, D. & Moussy, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel *in vivo* model for the testing of biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.*, 62(2):273-82, 2002.
- Venkatesan, P.; Puvvada, N.; Dash, R.; Prashanth Kumar, B. N.; Sarkar, D.; Azab, B.; Pathak, A.; Kundu, S. C.; Fisher, P. B. & Mandal, M. The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomaterials*, 32(15):3794-806, 2011.
- Vilos, C. & Velasquez, L. A. Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012:672760, 2012.
- Ziyad, S. & Iruela-Arispe, M. L. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes Cancer*, 2(12):1085-96, 2011.

Dirección para correspondencia:  
Dr. Carlos Rosas C.  
Escuela de Medicina  
Facultad de Medicina y Ciencia  
Universidad San Sebastián  
General Lagos 1163  
Valdivia  
CHILE

E-mail: carlos.rosas@uss.cl