

Especial: Investigación básica en caries dental

Péptidos sintéticos: una herramienta para el desarrollo de vacunas y agentes terapéuticos

Synthetic peptides: a tool for the development of vaccines and therapeutic agents

Fanny Guzmán Quimbayo*

Univ Odontol 2004 Jun-Dic; 24(54-55):120-124

RESUMEN

La síntesis de péptidos ha surgido como una herramienta poderosa en los laboratorios bioquímicos, farmacológicos, inmunológicos, biofísicos y neurológicos, para permitir el conocimiento de múltiples mecanismos funcionales en el ámbito celular, en el ámbito de la respuesta inmune frente a diversas enfermedades y en la implementación de nuevas sustancias inmunoproliféricas. En las últimas tres décadas, el empleo de los péptidos sintéticos se ha incrementado no sólo por el óptimo desarrollo de la síntesis química de los mismos, sino por sus implicaciones en la generación de una respuesta inmune protectora frente a diferentes enfermedades. Actualmente, se cuenta con diversas metodologías para la síntesis y producción a gran escala de un buen número de péptidos de una manera rápida y con altos rendi-

mientos. En esta revisión se busca evidenciar la importancia de los péptidos y su aplicación en diversos campos de la ciencia.

PALABRAS CLAVE

Péptidos, vacunas sintéticas, péptidos miméticos, pseudopéptidos, péptidos antimicrobianos

ABSTRACT

Peptide synthesis has become as the most powerful tool to obtain synthetic vaccines as well as new peptide-based drugs against infectious diseases such as Malaria and AIDS. During the last three decades an increasing number of synthetic peptide-based drugs have been offered in the market, but the most remarkable finding in this field has been the design and synthesis of the SPf-66

malaria vaccine which still remains as the most promising agent against human malaria. Based on this knowledge, the future of synthetic peptides will permit the finding and discovery of new and more potent vaccines to prevent human affecting diseases. This review describes the importance of having new methods to afford synthetic peptides as well as its implications on scientific research.

KEY WORDS

Peptides, synthetic vaccines, mimetic peptides, pseudopeptides, antimicrobial peptides

INTRODUCCIÓN

Los péptidos, al igual que las proteínas y sus derivados (glicoproteínas y lipoproteínas), desempeñan un papel importante como catalizadores biológicos, componentes estructurales, mensajeros moleculares, mediadores y moduladores de acciones biológicas, lo que ha permitido su utilización para el tratamiento de enfermedades.¹

Los péptidos son moléculas constituidas por subunidades llamadas aminoácidos, de los cuales existen 20 en las moléculas biológicas. Los aminoácidos, como su nombre lo indica, poseen una función ácida y una función amino (figura 1), pero no se comportan ni como ácidos ni como aminas. El carbono α es el centro de la molécula al cual están unidos el grupo amino, el grupo carboxilo y una cadena lateral R que individualiza e identifica a cada aminoácido.

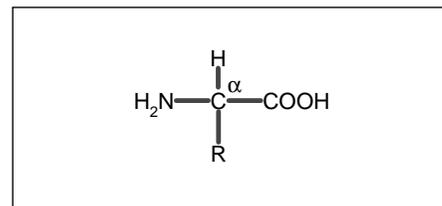


Figura 1. Estructura general de los aminoácidos

* Química, Universidad Nacional de Colombia, directora científica de ciencias química-física, Fundación Instituto de Inmunología de Colombia.

Tanto los péptidos y como las proteínas, están compuestos de aminoácidos y se diferencian por el tamaño. En general, las moléculas de menos de 100 aminoácidos se consideran como péptidos y las mayores proteínas, y su síntesis se realiza mediante la reacción del grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente aminoácido, formándose así el enlace peptídico. En los seres vivos, la síntesis de proteínas se lleva a cabo desde el extremo amino hacia el extremo carboxilo, y en el laboratorio, su síntesis se realiza en sentido inverso, debido a la fácil activación química del grupo carboxilo del aminoácido que reacciona con el grupo amino de otro aminoácido.²

La síntesis de péptidos ha sido un gran reto desde 1953, cuando Vicent du Vigneaud y su grupo preparó la oxitocina (pitosin) y la vasopresina, lo que le mereció el premio Nobel en 1956.³ En ese momento, el uso de los péptidos en medicina era bastante limitado debido a su complejidad química, difícil biodisponibilidad, fácil degradación o modificación química, alto costo y difícil manufactura.⁴ Solamente hasta 1959, Merrifield desarrolló

la idea de síntesis en fase sólida (figura 2), en la cual se adiciona consecutivamente aminoácido tras aminoácido sobre un soporte sólido, hasta obtener la secuencia deseada y una vez finalizada la síntesis se retira el péptido del soporte sólido al igual que los grupos que protegen las cadenas laterales de los aminoácidos. Por este logro, Merrifield mereció el premio Nobel en 1984.⁴

El desarrollo de la biología molecular en la década de los ochenta, permitió obtener miles de secuencias de proteínas, y para hacer uso de ellas, Richard Houghten desarrolló una de las metodologías que ha revolucionado la química de péptidos: la síntesis simultánea de péptidos, mediante la cual es posible sintetizar al mismo tiempo simultáneamente un gran número de ellos, ya que la idea de Merrifield fue sintetizar cada vez un péptido.⁵

Las dos estrategias de síntesis de péptidos en fase sólida más utilizadas son las estrategias t-Boc y Fmoc y su nombre se debe a los grupos protectores del extremo amino de los aminoácidos: t-Boc (*tert*-butiloxycarbonilo) y Fmoc (fluorenilme-

toxicarbonilo).⁶⁻⁸ Uno de los pasos cruciales en la síntesis de péptidos es la formación del enlace peptídico y el éxito del acople de dos aminoácidos depende de la reactividad del grupo carboxilo de un aminoácido N-protégido y de la accesibilidad estérica del grupo amino desprotegido del otro aminoácido. En el mejoramiento de la efectividad de los acoplos se han implementado el uso de diferentes solventes, soportes y activadores de grupos carboxilo; esto ha permitido que los procesos sean sencillos y rápidos, logrando así la síntesis de secuencias de difícil acoplamiento y asimismo la disponibilidad de un gran número de péptidos.^{4,9}

PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS

Debido a la resistencia que presentan los microorganismos frente a los antibióticos y al uso inadecuado de éstos, en la última década se han buscado péptidos con capacidad antimicrobiana a partir de diferentes especies animales. Algunos de estos péptidos son las magaininas 1 y 2 aisladas del sapo *Xenopus*,¹⁰ las defensinas aisladas de neutrófilos de conejos y de humanos¹¹ y las bacteninas 5 y 7 aisladas a partir de neutrófilos bovinos,¹² los cuales han mostrado actividad frente a bacterias gramnegativas y grampositivas, y su aislamiento y caracterización han permitido su obtención de manera sintética, facilitando el estudio de su actividad y su posible uso como antibiótico.

PÉPTIDOS COMO VACUNAS

Con el conocimiento de un gran número de proteínas antigénicas asociadas a la membrana de las bacterias, virus o parásitos, se ha logrado sintetizar las moléculas más inmunogénicas, determinadas a partir de estudios de receptor ligando; se establecen mediante ellos los epitopes más relevantes.¹³⁻¹⁸ Estos epitopes son sintetizados gene-

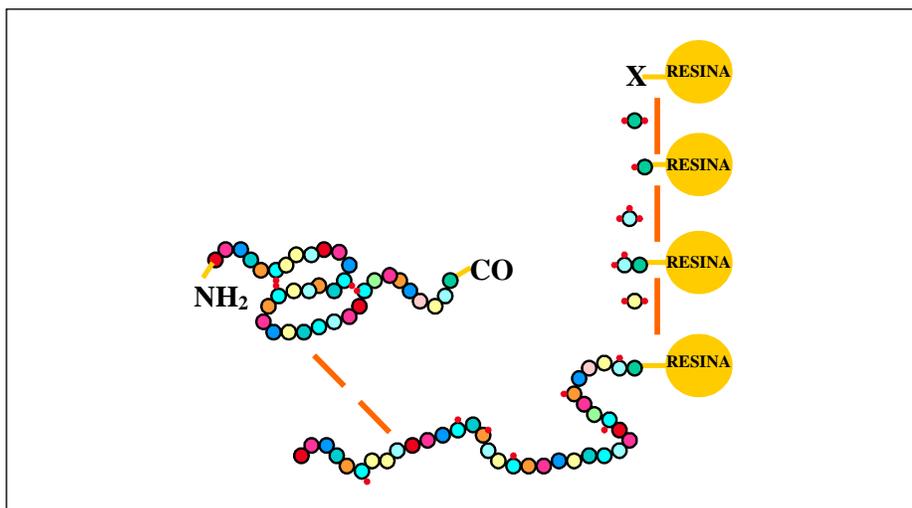


Figura 2. Esquema de la síntesis química de péptidos

ralmente en fragmentos de 20 aminoácidos, pero se ha encontrado que los péptidos cortos producen una respuesta inmunológica poco efectiva, por lo cual ha sido necesario potenciar su respuesta aumentando su peso molecular. Una de las metodologías utilizadas es la conjugación de los péptidos con proteínas transportadoras BSA y KLH las cuales no están permitidas para uso en humanos por presentar reactividad cruzada y efecto de supresión epítipo-específica.¹⁹

Para estimular la producción de anticuerpos y obtener una respuesta inmune duradera y eficaz, en los últimos 15 años surgió una serie de alternativas para aumentar el peso molecular de los péptidos; una de ellas es el diseño de la síntesis de polímeros de un mismo péptido, como en el caso de la primera vacuna antimalárica desarrollada en el Instituto de Inmunología,²⁰⁻²⁵ la cual consiste en la combinación de cuatro epítopes: tres del estadio de merozoito y uno de esporozoito con cisteínas en el extremo amino y carboxilo terminal para producir polímeros de un péptido de 45 residuos. Sin embargo, con la búsqueda de una sola especie caracterizable químicamente, han surgido otras alternativas como son la obtención de macromoléculas mediante la síntesis de MAP (sistemas de presentación de múltiples antígenos) y dendrímeros como los DDC (doble dímero de cisteínas). En la mayoría de estas metodologías se utilizan residuos lisina, la cual posee dos grupos amino que permiten duplicar el péptido a sintetizar.²⁶⁻²⁸

En algunos otros campos de investigación se adelantan estudios con el fin de utilizar péptidos antimicrobianos como posibles agentes terapéuticos; este es el caso de péptidos provenientes de la membrana de *S. mutans*, uno de los microorganismos causantes de la caries.²⁹ En estos estudios se en-

contraron dos péptidos de la proteína PAc (antígeno proteico de superficie) de *S. mutans* de los residuos 301-319 y 361-379, los cuales indujeron anticuerpos capaces de contrarrestar el crecimiento de *S. mutans* y actualmente se evalúa la posibilidad de su utilización como vacuna contra la caries.³⁰ Otras vacunas diseñadas a partir de péptidos provenientes de proteínas de superficie de microorganismos son la vacuna contra la influenza,³¹ VIH,³² esquistosomiasis,³³ hepatitis B,³⁴ cáncer³⁵⁻³⁶ y muchas otras que aún se encuentran en estudio y en fases preclínicas y clínicas de evaluación.³⁷⁻⁴⁰

PÉPTIDO MIMÉTICOS Y PSEUDOPÉPTIDOS

Los peptidomiméticos y pseudopéptidos son péptidos con variaciones, ya sea en su secuencia o en uno o varios enlaces peptídicos. Un ejemplo de variación de secuencia es la LGG-oxitocina, la cual ha mostrado tener una acción más duradera que la oxitocina normal no modificada; las modificaciones del ligando en los sitios de contacto con el receptor permitió una mejor efectividad en la respuesta. Otras modificaciones posibles son el cambio aminoácidos naturales L-aminoácidos por D-aminoácidos; con estas modificaciones se busca incrementar la estabilidad *in vivo* y la absorción, lo cual lleva a una mayor potencia, un incremento de la selectividad en la respuesta biológica y una simplicidad en su síntesis.⁴¹⁻⁴⁴ En la tabla 1, se muestran posibles variaciones que se pueden realizar sobre la secuencia de los péptidos.^{39, 45}

GLICOPÉPTIDOS

La presencia de carbohidratos, en un gran número de proteínas, ha llevado al estudio del efecto de la parte glicosídica en las características químicas y las funciones biológicas de éstas. La glicosilación de péptidos se

Tabla 1
Posibles variaciones en la secuencia de los péptidos

Para -NH-CHR'-CO-NH-CHR"-CO-
-NH-CO- (Retropéptidos, D-Residuos)
-CO-O- (Depsipéptidos)
-CH=CH-
-CH ₂ -CH ₂ - (Carbapéptidos)
-CH ₂ -NH- (Amida reducida)
-CH ₂ -S-
-CH ₂ -O-
-CO-N(NH ₂)- (N-péptidos)
-CO-NH-CO- (Urea péptidos)
-CO-NH-O-
NH-CO (Péptidos retroinversos)

puede realizar de manera sintética o enzimática, siendo la síntesis química el método más utilizado. Sin embargo, en algunos casos el uso de la alta especificidad y estereoselectividad de las enzimas ha ofrecido mejores rendimientos a los obtenidos por métodos de sintéticos.⁴⁶⁻⁴⁷

Los aminoácidos usualmente glicosilados químicamente son los mismos que se encuentran glicosilados naturalmente (asparagina, treonina y serina), los cuales a la vez permiten obtener los dos tipos de glicosilación, conocidos como N-glicosilación en el caso de asparagina y O-glicosilación para treonina y serina. En el caso de glicoconjugados, el reconocimiento de éstos según se ha observado en muchos trabajos, ofrece mayor especificidad y avidéz en las interacciones gracias al posible reconocimiento por parte de epítopes específicos tanto para la parte glicosídica como para el resto del conjugado. Por otro lado, la glicosilación de proteínas es un factor de virulencia de ciertas proteínas de patógenos como las encontradas en tuberculosis, ya que son éstas las que

le permiten unirse a receptores específicos para carbohidratos como el receptor de manosa (MR) y para finalmente invadir la célula blanco.⁴⁸

LIBRERÍAS DE PÉPTIDOS

En la búsqueda de péptidos óptimos o péptidos miméticos, las librerías de péptidos han sido en la última década una herramienta de investigación rápida y económica. Esta metodología consiste en sintetizar automáticamente mezclas o colecciones de péptidos a partir de secuencias conocidas, con el fin de determinar las variaciones en la secuencia que puedan mejorar las características inmunogénicas de los péptidos, las cuales permitirán buscar nuevos epítopes en las mismas.⁴⁹

PERSPECTIVAS

Además de las aplicaciones enumeradas en la revisión, existen muchos campos relacionados con el mejoramiento y el uso de los péptidos: la síntesis de citoquinas, péptidos amidados, péptidos para uso en diagnóstico de enfermedades, péptidos bioactivos, alergénicos, terapia de cáncer. Por sus diferentes aplicaciones, en todos los campos de investigación en ciencias biomédicas, los péptidos sintéticos seguirán siendo una de las herramientas más poderosas hacia la erradicación de las enfermedades que afectan al ser humano.

BIBLIOGRAFÍA

- Hruby VJ. Synthesis and use of large peptide libraries. *Collection Symposium Series* 1999; 1: 34-46
- Pennington MW, Dunn B. Peptide synthesis protocols. *Humana Press* 1994; 1-16
- Hodges R, Smith J. Peptides: Chemistry, structure and biology. *Proc 13th Am Peptide Symposium* 1993; 21-30
- Merrifield B. Solid phase peptide synthesis: new chemistry and new directions. *Collection Symposium Series* 1999; 1: 12-33
- Houghten RA. General method for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen antibody interaction at the level of individual aminoacids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5131-5
- Kent SBH. Peptides: Structure and function. In: Hruby VJ, Kopple KD (editors) *Proceedings 9th American Peptide Symposium*. Rockford, IL, USA: Pierce Chem, 1985; 407-14
- Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963; 85: 2149-54
- Carpino LA, Han GY. The 9-fluorenylmethoxycarbonylfunction a new base-sensitive amino-protecting group. *J Am Chem Soc* 1970; 92: 5748-9
- Stewart JM, Klis WA. Innovations and perspectives in solid phase synthesis. Epton edit., 1989
- Zaslloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 5449-53
- Miyakawa Y, Ratnakar P, Gururaj A, Costello M, Costello OM et al. In vitro activity of antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocytes protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996; 64(3): 926-32
- Gennaro R, Skeerlavaj B, Romeo D. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect Immun* 1989; 57(16): 3142-6
- Urquiza M, Suárez JE, Cárdenas C, López R, Puentes A et al. Related articles *Plasmodium falciparum* AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein. *Vaccine* 2000; 19(4-5): 508-13
- Suárez JE, Urquiza M, Curtidor H, Guzmán LE, Ocampo M, Torres E et al. Related articles A GBP 130 derived peptide from *Plasmodium falciparum* binds to human erythrocytes and inhibits merozoite invasion in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(4): 495-501
- Rodríguez LE, Urquiza M, Ocampo M, Suárez J, Curtidor H, Guzmán F et al. Related articles *Plasmodium falciparum* EBA-175 kDa protein peptides which bind to human red blood cells. *Parasitol* 2000; 120: 225-35
- Ocampo M, Urquiza M, Guzmán F, Rodríguez LE, Suárez J, Curtidor H et al. Related articles two MSA 2 peptides that bind to human red blood cells are relevant to *Plasmodium falciparum* merozoite invasion. *J Pept Res* 2000; 55(3): 216-23
- Vera Bravo R, Marin V, García J, Urquiza M, Torres E, Trujillo M et al. Related articles amino terminal peptides of the ring infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* bind specifically to erythrocytes. *Vaccine* 2000; 8(14):289-93
- Calvo M, Guzmán F, Pérez E, Segura CH, Molano A, Patarroyo ME. Specific interactions of synthetic peptides derived from *P. falciparum* merozoite proteins with human red blood cells. *Peptide Res* 1991; 1(6): 324-32
- Geerlings HJ, Weiger WJ, Welling GW, Welling WS. The influence of different adjuvants on the immune response to a synthetic peptide comprising aminoacid residues 9-21 of Herpes Simplex Virus type 1 glycoprotein D. *J Immunol Methods* 1989; 124: 95-102
- Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martínez A et al. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 1987; 328(6131): 629-32
- Amador R, Guzmán F, Patarroyo ME. Safety and immunogenicity of the synthetic malaria vaccine Spf66 in large field trial. *J Infect Dis* 1992; 166: 134-44
- Amador R, Moreno A, Valero MV, Murillo L, Mora A, Rojas M et al. The first field trials of the chemically synthesized malaria vaccine Spf66. *Vaccine* 1992; 10(3): 179-84
- Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzmán F, Romero P et al. Synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* Malaria. *Nature* 1988; 323: 158-61
- Valero MV, Amador R, Aponte JJ, Narváez A, Galindo C, Silva Y et al. Evaluation of Spf66 malaria vaccine during a 22-month follow-up field trial in the Pacific Coast of Colombia. *Vaccine* 1996; 14(15): 1466-70
- Molano A, Segura C, Guzmán F, Lozada D, Patarroyo ME. In human malaria protective antibodies are directed mainly against the Lys-Glu-Lys motif of the synthetic vaccine SPf-66. *Parasite Immunol* 1992; 14: 111-24
- Tam JP, Zavala F. Multiple antigen peptide. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. *J Immunol Methods* 1989; 124: 53-61
- Chaves F, Calvo JC, Carvajal C, Rivera Z, Ramírez LE, Pinto M et al. Synthesis, isolation and characterization of *Plasmodium falciparum* antigenic tetrabranch peptide dendrimers obtained by thiazolidine linkages. *J Pept Res* 2001 Oct; 58(4): 307-16
- Rivera Z, Granados G, Pinto M, Carvajal C, Chaves F, Calvo JC et al. Double dimer peptide constructs are immunogenic and protective against *Plasmodium falciparum* in the experimental *Aotus* monkey model. *J Pept Res* 2002 Feb; 59(2): 62-70
- Argüello G, Lozano JM. Actividad *in vitro* de péptidos antimicrobianos sintéticos en cepas de *S. mutans*. *Univ Odontol* 1999 May; 19(38): 7-12
- Senpuku H, Yanagi K, Nisizawa T. *Streptococcus mutans* PAc peptides. *Immunol* 1998; 95: 322-30
- Rose K, Zeng W, Brown LE, Jackson DC. A synthetic peptide-based polyoxime vaccine construct of high purity and activity. *Mol Immunol* 1995; 32: 1031-7
- Sarin PS, Mora CA, Naylor PH, Markham R, Schwartz D, Kahn J et al. A HIV-1 p17 synthetic peptide vaccine HGP-30: Induction of immune response in human subjects and preliminary evidence of protection against HIV challenge in SCID mice. *Cell Mol Biol* 1995; 41: 401-7
- Reynolds SR, Shoemaker CB, Harn DA. T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1992; 149: 3995-4001
- Steward MW, Partidos CD, D'Mello F, Howard CR. Specificity of antibodies reactive with hepatitis B

- surface antigen following immunization with synthetic peptides. *Vaccine* 1993; 11: 1405-14
35. Linehan DC, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. Vaccine therapy for cancer. *Ann Surg Oncol* 1996; 3: 219-28
 36. Avichezer D, Taylor-Papadimitriou J, Arnon R. A short synthetic peptide (DTRPAP) induces anti-mucin (MUC-1) antibody, which is reactive with human ovarian and breast cancer cells. *Cancer Biochem Biophys* 1998 Jun; 16(1-2): 113-28
 37. Puentes F, Guzmán F, Marín V, Alonso C, Patarroyo ME, Moreno A. Leishmania: Fine mapping of the Leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization. *Exp Parasitol* 1999 Sep; 93(1): 7-22
 38. Morales G, Carrillo G, Requena JM, Guzmán F, Gómez LC, Patarroyo ME et al. Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral Leishmaniasis. *Parasitol* 1997; 114: 507-16
 39. Robinson J, Rosas M, Guzmán F, Patarroyo ME, Moreno A. Comparison of prevalence of anti-hepatitis C virus antibodies in differing South American populations. *J Med Virol* 1996; 50: 188-92
 40. Patarroyo ME, Parra CA, Pinilla C, del Portillo P, Torres ML, Clavijo P et al. Immunogenic synthetic peptides against mycobacteria of potential immunodiagnostic and immunoprophylactic value. *Lepr Rev* 1986; 2: 163-8
 41. Calvo JC, Barrera NF, García JA, Guzmán F, Espejo F, Patarroyo ME. Síntesis de la oxitocina en fase sólida usando terbutoxicarbonilo y fluorenilmetoxicarbonilo derivados. *Rev Colombiana Química* 1999; 28 (1): 19-25
 42. Lozano JM, Espejo F, Díaz D, Pinzón C, Rodríguez J, Calvo JC et al. Reduced amide pseudopeptide analogues of a malaria peptide possess secondary structural elements responsible for induction of functional antibodies which react with *Plasmodium falciparum* erythrocytic forms. *J Pept Res* 1998; 52(6): 457-69
 43. Liroy E, Suárez J, Guzmán F, Siegerist S, Pluschke G, Patarroyo ME. Synthesis, biological and immunological properties of cyclic peptides from *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. *Angew Chem Int Ed Engl* 2001; 40(14): 2631-5
 44. Espejo F, Cubillos M, Salazar LM, Guzmán F, Urquiza M, Ocampo M et al. Structure, immunogenicity and protectivity relationship of the 1585 malarial peptide and its substitution analogs. *Angew Chem Int Ed Engl* 2001 Dec 17; 40(24): 4654-7
 45. Brass JM, Frank J, Wagner FW, Stocker H. Semisynthesis of peptide- new strategy for specific protection and deprotection of the —amino group of recombinantly—produced peptide fragments. *Collection Symposium Series* 1999; 1: 165-77
 46. Meldal M, St Hilaire PM. Synthetic methods of glycopeptide assembly, and biological analysis of glycopeptide products. *Curr Op Chem Biol* 1997, 1: 552-63
 47. Herzner H, Reipen T, Schultz M, Kunz H. Synthesis of glycopeptides containing carbohydrate and peptide recognition motifs. *Chem Rev* 2000 Dec 13; 100(12): 4495-538
 48. Varon D, Liroy E, Patarroyo ME, Unverzagt C. Synthesis of mannosyl and oligomannosyl threonine building blocks derived from MPT32 glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Aust J Chem* 2002; 55: 1-5
 49. Ostresh JM, Husar GM, Blondelle SE, Dorner B, Weber PA, Houghten RA. Related articles from libraries: Chemical transformation of combinatorial libraries to extend the range and repertoire of chemical diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(23): 11138-42

CORRESPONDENCIA

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia.

Diagonal 52 # 34-53.

A. A. 33086.

Bogotá, D. C., Colombia.

Teléfono: +57-1-2207700,

extensión 477. Fax: +57-1-2803999.

Correo electrónico:

fannyguz@latinmail.com

Recibido para publicación:
septiembre 26 de 2003.

Aceptado para publicación:
abril 24 de 2004.