



# PERCEPCIÓN DE SEÑALES DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES POR PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN LAS FASES INICIALES DEL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS

Perception of arbuscular mycorrhizal fungus' signals by tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) at initial stages of symbiosis establishment

Eduardo Pérez<sup>1</sup>✉, Yakelín Rodríguez<sup>1</sup>, Kalyanne Fernández<sup>1</sup>, Blanca M. de la Noval<sup>1</sup> y A. Hernández<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** The signal perception established between plants and microorganisms cohabiting with them induce different reactions that range from neutral to defensive. The symbiosis with mycorrhizal arbuscular fungi (AMF) is the most widespread on the planet and the mechanisms used by these fungus to colonize plants as well as the perception of signals emitted are in the focus of research today because the speed which those signals are perceived allow them to compete with other microorganisms present in the rhizosphere for the establishment' niche, taking into account that not all mycorrhizal fungus colonize with the same intensity and that intensity of colonization depends, primarily, on the species- soil fertility relationship. Therefore, this experiment was carried out to compare two of the strains most frequently used from INCA AMF' strain collection in order to check the speed of plants can perceived the signals emitted by these AMF, and it was evaluated using defense enzymes. A swift activation of these enzymes at initial stages of dynamic was observed; but the activation diminishes as soon as recognition achieved. Inoculated plants with *G. cubense* shown faster responses, according the dynamic of activation; this could be according to the criteria of strain recommendation for this specie which has been shown the better agronomic effects for this soil condition.

**RESUMEN.** La percepción de las señales que se establecen entre las plantas y los microorganismos que cohabitan con ellas inducen diferentes reacciones que pueden ser desde neutras hasta defensivas. La simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) es la más extendida en el planeta y los mecanismos por los cuales colonizan a la planta, así como la percepción de las señales que emiten se encuentran en el foco de investigación de la actualidad, dado que la rapidez con que sean percibidas las señales les permitirá competir con otros microorganismos presentes en la rizósfera por el nicho de establecimiento, teniendo en cuenta que no todos colonizan con la misma intensidad y que esto depende en primer término de la relación especie-fertilidad del suelo. Por ello se realizó este experimento de comparación con dos de las cepas más utilizadas del cepario del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) para comprobar la rapidez de la percepción de las señales de estos HMA por las plantas y se evaluó a través de dos enzimas relacionadas con la defensa. Se observó una rápida inducción de las actividades de estas enzimas al inicio de la dinámica, que disminuyó rápidamente en la medida que se inició el reconocimiento entre los simbioses. Las plantas inoculadas con *G. cubense* respondieron más rápido, según pudo observarse en la dinámicas de activación y esto podría relacionarse con el hecho de ser la cepa recomendada para esta condición de suelo por sus efectos agronómicos demostrados.

**Key words:** Mycorrhizae, pectinolytic enzymes, defense mechanisms

**Palabras clave:** Mycorrhizae, enzimas pectinolíticas, mecanismos de defensa

## INTRODUCCION

Las plantas son organismos vivos que se comunican con otros organismos en su ambiente. Dado que las plantas no pueden ver, oír o caminar emiten señales que les permiten percibir los cambios en el ambiente y sobrevivir. Las plantas producen y exudan

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32 700.

<sup>2</sup>Facultad de Biología Universidad de la Habana, Cuba.

✉ [eduardo@inca.edu.cu](mailto:eduardo@inca.edu.cu)

a través de la raíz una gran variedad de químicos entre los que se encuentran azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, reguladores del crecimiento y metabolitos secundarios, algunos de los cuales utilizan para la comunicación con su ambiente (1).

Entre las interacciones que se producen en la rizósfera se pueden mencionar las raíz-raíz, raíz-microorganismos y raíz-insectos. Muchas de estas interacciones tienen efecto neutro sobre las plantas. Sin embargo, en la rizósfera se encuentran también las que se establecen con los mutualistas o los que son beneficiosos (2).

Por su parte, los microorganismos pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas de forma positiva o negativa, así como cambiar la dinámica de los nutrientes, la susceptibilidad a enfermedades la tolerancia a metales pesados y pueden además ayudar a las plantas en la degradación de xenobióticos (3). Como resultado, la interacción planta-microorganismo presenta un potencial considerable para la explotación biotecnológica. Un buen ejemplo sería poder manipular las señales que toman lugar en la rizósfera, en la cual las plantas usan sus raíces para comunicarse e interactuar con otros microorganismos (1).

Entre las más antiguas asociaciones simbióticas de las plantas se encuentran las micorrizas arbusculares que se establecen con hongos del phylum Glomeromycota. Esta simbiosis que la forman más del 80 % de las plantas terrestres se considera la más extendida en el planeta y su desarrollo resulta en la formación de estructuras subcelulares dentro de la planta conocidas como arbuscúlos que resultan en el sitio principal de intercambio de nutrientes entre la planta y su par asociado (4). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se conectan a la planta a través de una red hifal que puede exceder 100 metros de hifas por centímetro cúbico de suelo y está especializada en la toma de nutrientes y agua (5). A cambio la planta suplementa al hongo con carbohidratos provenientes de la fotosíntesis. El 20 % de los productos de la fotosíntesis (cerca de 5 billones de toneladas de carbono por año) se estiman que son consumidos por el hongo micorrízico, por lo tanto estos hongos contribuyen significativamente al ciclaje de fosfato y carbono e influyen la productividad en los ecosistemas terrestres (6).

El control bidireccional ejercido por ambos simbioses implica importantes cambios en el metabolismo primario y secundario y la regulación de los mecanismos defensivos de la planta (7) y tienen un importante impacto en su fisiología, alterando las capacidades de la planta para enfrentar estrés bióticos y abióticos (8, 9, 10).

Es conocido que no todos los HMA resultan tener igual eficiencia en diferentes ambientes edáficos y que hay una relación específica entre su eficiencia, en términos agronómicos, y la fertilidad y el pH de los suelos (11, 12). Debido a estas razones podría pensarse que la percepción de las señales emitidas

por estos hongos determinan, no solo su eficiencia en términos de competencia por el nicho de colonización, sino también la rapidez con que estos colonizan las plantas y, por tanto, comienzan a pasar de la fase de estrés biótico a la fase de simbiote<sup>A</sup>.

A pesar de ello, los estudios de la percepción de señales que estos hongos inducen en la planta aún se encuentran en fases iniciales por el hecho de su biotrofismo obligatorio (1, 13), por lo que este trabajo tuvo como objetivo evaluar los cambios en las actividades relacionadas con la defensa inducidos por dos HMA en plantas de tomate en la fase inicial del establecimiento de la simbiosis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

Se empleó la variedad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Amalia obtenida por el Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) como modelo de estudio porque se conoce que induce sistemas defensivos en etapas tardías de la colonización.

### MATERIAL FÚNGICO

Se utilizaron las cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) *Glomus mosseae* (Nicolson & Schenck), INCAM-2; *G. cubense* (Y. Rodr. & Dalpé), INCAM-4; procedentes del cepario del Laboratorio de Micorrizas del INCA, San José de las Lajas, Mayabeque. Las especies se conservaron en un sustrato desarrollado para estos fines (Registro de patente No.2264) a 4°C. Los inóculos de HMA utilizados en los experimentos poseían un título promedio de 50 esporas g<sup>-1</sup> de sustrato, certificado en el Laboratorio de Micorrizas del INCA.

### CONDICIONES EXPERIMENTALES

El experimento se desarrolló en cepellones, con un sustrato esterilizado por calor a 121 °C por 1 h durante tres días alternos conformado por una mezcla de suelo Ferralítico Rojo lixiviado típico (14) y humus de lombriz en relación 3:1 (p/p). Las características agroquímicas del sustrato empleado se muestran en la Tabla I.

Las plantas se desarrollaron en condiciones controladas de temperatura (23 ± 2 °C), humedad relativa (80-85 %) y fotoperíodo natural (14 horas luz -10 horas oscuridad). Los experimentos se ejecutaron en condiciones de casa de cristal en las áreas del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>A</sup>Pérez, E. *Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para la bioprotección de patógenos en el cultivo del tomate (Solanum Lycopersicum L.)* [Tesis de Doctorado], Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 2010.

**Tabla I. Características agroquímicas del sustrato.**

Localidad	Sustrato	K <sup>+</sup> (cmol kg <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup> (cmol kg <sup>-1</sup> )	Mg <sup>2+</sup> (cmol kg <sup>-1</sup> )	P (ppm)	Materia Orgánica (%)	pH (al H <sub>2</sub> O)
San José de las Lajas, La Habana	Suelo Ferralítico Rojo lixiviado típico: humus de lombriz (3:1)	0,6	18,9	6,0	160	6,9	7,3

Determinaciones químicas: pH al H<sub>2</sub>O, Potenciómetro; Materia Orgánica (MO), Walkley Black; Fósforo (P), Oniani; Cationes, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, Método de Maslova.

### DINÁMICA DE INDUCCIÓN TEMPORAL Y LOCAL DE PR 2 (B 1,3 GLUCANASAS) Y PR 3 (QUITINASAS), EN PLANTAS MICORRIZADAS CON LAS CEPAS PROMISORIAS

Para evaluar la inducción de PR2 y PR3 en las primeras horas del proceso de micorrización, se sembraron las semillas en el sustrato presentado en la Tabla I y se mantuvieron en las condiciones antes descritas. En el día 21 (después de la germinación) se inocularon las plantas, por la vía radical, con los hongos micorrízicos seleccionados, en forma líquida utilizando una suspensión de esporas (10<sup>5</sup> esporas mL<sup>-1</sup>), en una solución protegida osmóticamente (solicitud de Patente Nacional, OCPI 2004-0272). Las muestras de raíces se tomaron a las 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24 y 48 horas, después de la aplicación de la suspensión.

Las muestras de raíces se maceraron en nitrógeno líquido y se homogenizaron en proporción 1:2 (g mL<sup>-1</sup>), con solución amortiguadora de extracción (acetato de sodio, 0,1 M, pH 5,2; que contenía 5 g de polivinilpirrolidona y 0,05 g de β-mercaptoetanol, en 100 mL de solución de extracción). El homogenato se agitó en zaranda durante 45 minutos, en baño de hielo. Posteriormente se filtró y se centrifugó a 14 000 x G, a 4 °C durante 25 minutos, en centrífuga refrigerada (Beckman, modelo J2-21). El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso, para las determinaciones de la actividad enzimática por las metodologías presentadas en la Tabla II. La concentración de proteínas se determinó según Bradford (1976).

### DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los experimentos se desarrollaron siguiendo un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones y se reprodujeron en dos momentos diferentes.

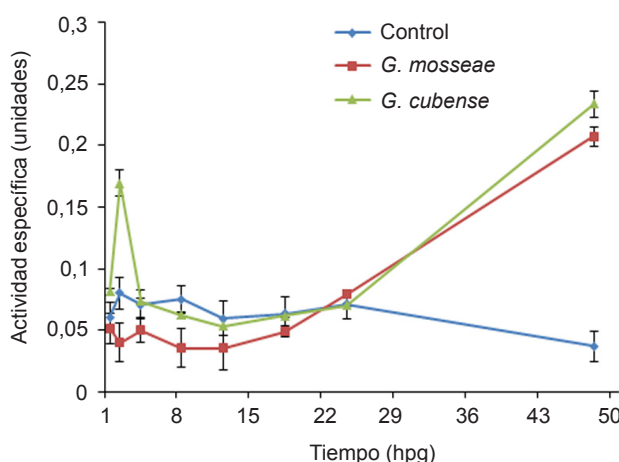
Se calculó el intervalo de confianza de las medias al 95 % de probabilidad, atendiendo al número de repeticiones y la reproducibilidad de los datos.

**Tabla II. Determinaciones realizadas.**

Determinación	Método de cuantificación	Sustrato	λ nm	Unidades (referidas como UAE)
β-1,3-glucanasas (PR2)	Dangrois <i>et al.</i> (1992)	Laminarina	450	μKat mg <sup>-1</sup> proteína
Quitinasas (PR3)	Boller <i>et al.</i> (1983)	Quitina coloidal	585	pKat mg <sup>-1</sup> proteína

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

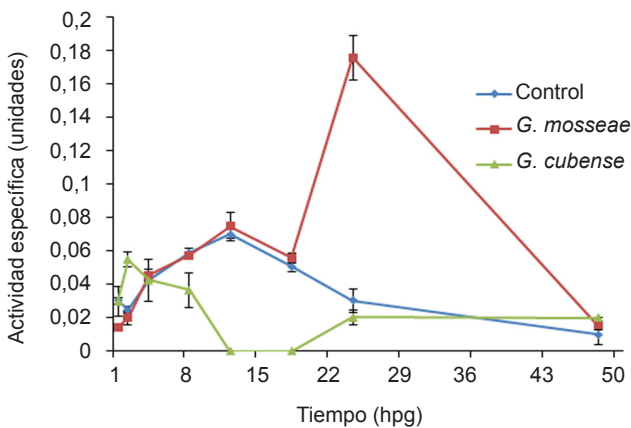
La Figura 1 muestra la dinámica de activación encontrada, a nivel local, en raíces, para la enzima β 1, 3 glucanasa horas después de haber sido inoculadas con los HMA en estudio. Se aprecia que la inducción es rápida, dado que se detectaron niveles de actividad enzimática que en el caso *G. cubense* superaron a las plantas sin inocular desde la hora uno y hasta la cuatro. Por su parte, la cepa *G. mosseae* aunque con valores inferiores al testigo, también presentó niveles de actividad desde la hora uno. En las horas finales de esta dinámica (48 horas) se observó un incremento significativamente superior en las plantas tratadas con respecto al testigo sin inocular.



Las barras representan los intervalos de confianza de la media para ( $p \leq 0,05$  %) ( $n=6$ ).

**Figura 1. Dinámica de inducción de actividad β 1-3 glucanasas (PR 2) en raíces de plantas de tomate inoculadas con *G. mosseae* y *G. cubense* horas después de inducida la micorrización.**

La Figura 2 muestra la dinámica de activación de la enzima quitinasa en raíces de plantas inoculadas, horas después de ser inducida la micorrización. Se observa que las plantas inoculadas con *G. cubense* presentan niveles de activación al inicio de la dinámica que disminuye a las 12 horas, estas plantas presentan una nueva inducción en la hora 17 que se mantiene hasta el final de la dinámica. Las plantas tratadas con *G. mosseae* mostraron un comportamiento similar a las plantas testigo, las que inicialmente presentan una baja actividad y un máximo a las 12 horas. Las plantas testigo a partir de este momento disminuyen la actividad hasta el final de la dinámica, no ocurriendo así con las plantas micorrizadas con *G. mosseae* que presentan un máximo de activación en la hora 24 y disminuye con el tiempo.



Las barras representan los intervalos de confianza de la media para  $p \leq 0,05$  % ( $n=6$ ).

**Figura 2. Dinámica de inducción de actividad quitinasa (PR 3) en raíces de plantas de tomate micorrizadas con *G. mosseae* y *G. cubense* horas después de inducir la micorrización.**

De modo general, se observa que para ambas cepas fue rápida y elevada la inducción de PRs a nivel local, lo que indica que la percepción de las señales que se establecen entre las cepas y las plantas de tomate fue efectiva.

La inducción de mecanismos defensivos por estos hongos formadores de micorrizas arbusculares que es deprimida como consecuencia del reconocimiento molecular entre los simbiontes, provoca una supresión de los eventos moleculares que permiten la acción defensiva por parte de la planta y está en correspondencia con lo obtenido por otros autores (15). Esta depresión es debida fundamentalmente al hecho descrito por estos autores relacionado con la secreción de una proteína efectora por los HMA que promueve la biotrofia simbiótica, actuando sobre los genes defensivos de las plantas. Este hecho promueve

la colonización de los HMA en el sistema radical, que a partir de la percepción de señales de forma rápida provocó niveles de inducción de PR proteínas que tienden a disminuir después de haber sido enfrentados los simbiontes y debe ser la causa de la disminución de las actividades detectadas. Este hecho indica que en la medida que la planta y los HMA comienzan a interactuar la dinámica en el tiempo de inducción de mecanismos de defensa debe disminuir, si se considera que pasan de una fase de estrés biótico a simbiótico, lo que se puede predecir por el rápido establecimiento de las señales que se establecen entre ambas partes.

Los resultados de inducción temprana de  $\beta$  1, 3 glucanasa, así como la detección de niveles basales en las plantas sin micorrizar coinciden con los informados al encontrar niveles de activación de la enzima desde horas tempranas de la colonización. Los niveles basales de actividad para ambas enzimas podrían estar asociados con procesos de diferenciación celular. En el caso de las plantas micorrizadas estos niveles, además, se pueden asociar al crecimiento hifal en las raíces de las plantas<sup>A</sup>.

La existencia de un máximo de actividad en las plantas inoculadas con *G. cubense* en el inicio de la dinámica de actividad de  $\beta$  1,3 glucanasa indica que la presencia del HMA en la raíz, induce la activación de esta enzima, que además de actuar en los procesos de diferenciación celular antes mencionados, participa en la degradación de las paredes celulares de los hongos debido a la presencia de  $\beta$  1,3 glucanos en las mismas (16), lo que permite este reconocimiento entre la planta y los hongos micorrízicos empleados y que es más evidente para la cepa *G. cubense*. Además, se ha informado que la percepción de las señales por las plantas produce cambios morfológicos en la célula hospedante que se comienza a preparar para la colonización con la formación de un aparato de prepenetración que involucra la activación de enzimas que favorecen el crecimiento hifal del hongo en la raíz (17).

De igual forma, las quitinasas presentes en las plantas, dado su papel en las respuestas de defensa, generan la producción de elicitores que inducen respuestas más débiles en plantas micorrizadas que en aquellas que se enfrentan a microorganismos patógenos (13).

La elevación de las actividades enzimáticas al inicio de las dinámicas realizadas, seguida por una disminución rápida que llega hasta los niveles basales de actividad, supone una rápida interacción y reconocimiento entre las plantas y el HMA. Está demostrado que el reconocimiento entre la planta y el hongo HMA hace que cese la respuesta defensiva por parte de la planta (13, 15) y que el rápido reconocimiento de los simbiontes suprima rápidamente los patrones defensivos de la misma.

El hecho de que la inducción y el reconocimiento, entendido como la activación y la disminución de las actividades enzimáticas, permita señalar a la cepa *G. cubense* como la que más rápido fue percibida por la planta, podría estar relacionado con el hecho de que esta cepa es la que se recomienda para esta condición de fertilidad y pH de suelo por sus efectos agronómicos observados.

## BIBLIOGRAFÍA

- López-Ráez, J.A.; Bouwmeester, H. y Pozo, M.J. "Communication in the Rhizosphere, a Target for Pest Management" [en línea], ed. Lichtfouse, E., *Agroecology and Strategies for Climate Change*, edit. Springer Netherlands, 2012, (ser. Sustainable Agriculture Reviews, no. ser. 8), pp. 109-133, ISBN 978-94-007-1904-0, [Consultado: 14 de marzo de 2015], Disponible en: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1905-7\\_5](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1905-7_5)>.
- Raaijmakers, J.M.; Paulitz, T.C.; Steinberg, C.; Alabouvette, C. y Moëne-Loccoz, Y. "The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms", *Plant and Soil*, vol. 321, no. 1-2, 23 de febrero de 2008, pp. 341-361, ISSN 0032-079X, 1573-5036, DOI 10.1007/s11104-008-9568-6.
- Morgan, J.A.W.; Bending, G.D. y White, P.J. "Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere", *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, no. 417, 2005, pp. 1729-1739, ISSN 1460-2431.
- Parniske, M. "Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses", *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 10, 2008, pp. 763-775, ISSN 1740-1534.
- Verbruggen, E.; van der Heijden, M.G.A.; Rillig, M.C. y Kiers, E.T. "Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success", *New Phytologist*, vol. 197, no. 4, 1 de marzo de 2013, pp. 1104-1109, ISSN 1469-8137, DOI 10.1111/j.1469-8137.2012.04348.x.
- Dodd, I.C. y Ruiz-Lozano, J.M. "Microbial enhancement of crop resource use efficiency", *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2, abril de 2012, (ser. Food biotechnology - Plant biotechnology), pp. 236-242, ISSN 0958-1669, DOI 10.1016/j.copbio.2011.09.005.
- Kiers, E.T.; Duhamel, M.; Beesetty, Y.; Mensah, J.A.; Franken, O.; Verbruggen, E.; Fellbaum, C.R.; Kowalchuk, G.A.; Hart, M.M.; Bago, A. y others "Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis", *Science*, vol. 333, no. 6044, 2011, pp. 880-882, ISSN 1095-920, DOI 10.1126/science.1208473.
- Miransari, M. "Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress", *Plant Biology*, vol. 12, no. 4, 1 de julio de 2010, pp. 563-569, ISSN 1438-8677, DOI 10.1111/j.1438-8677.2009.00308.x.
- Smith, S.E.; Facelli, E.; Pope, S. y Smith, F.A. "Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas", *Plant and Soil*, vol. 326, no. 1-2, 19 de mayo de 2009, pp. 3-20, ISSN 0032-079X, 1573-5036, DOI 10.1007/s11104-009-9981-5.
- Campos-Soriano, L.; García-Martínez, J. y Segundo, B.S. "The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection", *Molecular Plant Pathology*, vol. 13, no. 6, 1 de agosto de 2012, pp. 579-592, ISSN 1364-3703, DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00773.x.
- Herrera-Peraza, R.A.; Hamel, C.; Fernández, F.; Ferrer, R.L. y Furrázola, E. "Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants?", *Mycorrhiza*, vol. 21, no. 3, 16 de junio de 2010, pp. 183-193, ISSN 0940-6360, 1432-1890, DOI 10.1007/s00572-010-0322-6.
- Fester, T. y Sawers, R. "Progress and Challenges in Agricultural Applications of Arbuscular Mycorrhizal Fungi", *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 30, no. 5, 1 de septiembre de 2011, pp. 459-470, ISSN 0735-2689, DOI 10.1080/07352689.2011.605741.
- Jung, S.C.; Martínez-Medina, A.; López-Ráez, J.A. y Pozo, M.J. "Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses", *Journal of Chemical Ecology*, vol. 38, no. 6, 24 de mayo de 2012, pp. 651-664, ISSN 0098-0331, 1573-1561, DOI 10.1007/s10886-012-0134-6.
- Hernández, A.; Pérez, J.; Bosch, D. y Castro, N. *Clasificación de los suelos de Cuba 2015*, edit. Ediciones INCA, Mayabeque, Cuba, 2015, p. 93, ISBN 978-959-7023-77-7.
- Kloppholz, S.; Kuhn, H. y Requena, N. "A Secreted Fungal Effector of Glomus intraradices Promotes Symbiotic Biotrophy", *Current Biology*, vol. 21, no. 14, 26 de julio de 2011, pp. 1204-1209, ISSN 0960-9822, DOI 10.1016/j.cub.2011.06.044.
- Gianinazzi-Pearson, V. "Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis.", *The Plant Cell*, vol. 8, no. 10, 1996, p. 1871, ISSN 1532-298X.
- Bonfante, P. y Requena, N. "Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis", *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 14, no. 4, agosto de 2011, (ser. Biotic interactions), pp. 451-457, ISSN 1369-5266, DOI 10.1016/j.pbi.2011.03.014.

Recibido: 9 de enero de 2014

Aceptado: 12 de enero de 2015

### ¿Cómo citar?

Pérez, Eduardo.; Rodríguez, Yakelín.; Fernández, Kalyanne; de la Noval, Blanca M. y Hernández, Alberto. Percepción de señales de los hongos micorrízicos arbusculares por plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en las fases iniciales del establecimiento de la simbiosis. [en línea]. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. 3, pp. 40-44. ISSN 1819-4087. [Consultado: \_\_\_\_]. Disponible en: <-----/>