

# Evaluación de hipermetilación del gen $p16^{INK4\alpha}$ en cáncer escamoso de pulmón en pacientes chilenos

WALDO ADONIS R.\*, FRANCISCO AGUAYO G.\*\*, EUGENIA CORDERO S.\*, LUIS RODRÍGUEZ A.\*, DARWINS CASTILLO A.\* y LEDA GUZMÁN M.\*\*\*\*

## Hypermethylation of gene $p16^{INK4\alpha}$ in Chilean Patients with Squamous Cell Lung Carcinoma

*The silencing of  $p16^{INK4\alpha}$  (p16) tumor suppressor gene by aberrant methylation has been described as a common event in human tumoral types, such as squamous cell lung carcinoma (SCLC). This is a very frequent histological type in Chile, usually associated to chronic smokers. The purpose of this study was to investigate the p16 methylation status in patients with SCLC. Using a MSP (methylation-specific PCR), we determined that 25 out of 29 (86%) of SCLC patients had hypermethylation of p16 gene. There was also a significant concordance between hypermethylation of p16 gene and the presence of SCLC ( $p = 0.00005$ ). According to our results, smokers have a 202-fold higher risk to develop SCLC than no-smokers (odds ratio, 201,7; 95% confidence interval, 7.18-5593). Therefore, our results suggest that hypermethylation of p16 gene is an useful prognostic marker in chronic smokers candidates to develop SCLC and patient with clinic suspicion of SCLC.*

**Key words:** Aberrant methylation; p16 gene; squamous lung carcinoma; smokers.

## Resumen

*El silenciamiento génico por metilación aberrante del gen  $p16^{INK4\alpha}$  (p16) ha sido descrito en varios tipos de tumores humanos, como por ejemplo, el carcinoma escamoso de pulmón (CEP), un tipo histológico frecuente en Chile, asociado a tabaquismo crónico. El propósito de este estudio fue determinar el estado de metilación de la región promotora de p16 en CEP. Utilizando un método de PCR específico para metilación, se determinó que un total de 29 pacientes con CEP, 25 (86%) tenían el gen p16 hipermetilado. Además, se encontró una correlación significativa entre la hipermetilación del gen p16 y la presencia de CEP ( $p = 0,00005$ ). Por otra parte, estimamos que los individuos fumadores tienen 201,7 veces más riesgo que los no fumadores de desarrollar CEP (odds ratio, 201,7; intervalo de confianza 95%, 7,18-5.593). Nuestros resultados sugieren que la detección de hipermetilación del gen p16 podría ser utilizada como un marcador molecular de diagnóstico precoz en individuos fumadores con riesgo a desarrollar CEP y en pacientes con sospecha clínica de CEP.*

**Palabras claves:** Metilación aberrante; gen p16; carcinoma escamoso de pulmón de células no pequeñas; fumadores.

\* Laboratorio Nacional y de Referencia de Inmunología, Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago de Chile.

\*\* Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Laboratorios, Instituto Nacional del Tórax .

\*\*\* Sección Inmunodiagnóstico, Instituto de Salud Pública de Chile.

Financiamiento: Esta investigación fue financiada en parte por la Sociedad Chilena de Enfermedades Respiratorias y el Instituto de Salud Pública.

## Introducción

El cáncer pulmonar (CP) constituye la primera causa de muerte por cáncer en la población mundial<sup>1,2</sup>. En Chile representa la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y la quinta en mujeres<sup>3,4</sup>. El 75% de los casos de CP en nuestro país, corresponden al tipo de células no pequeñas (CPCNP), donde el carcinoma escamoso de pulmón (CEP) representa entre un 25% a 50% de los casos de CP. CEP es una forma epidemiológica asociada a tabaquismo crónico<sup>5,6</sup>. La resección quirúrgica sigue siendo el tratamiento utilizado en CPCNP, pero su efectividad es limitada por un diagnóstico tardío, lo que lleva a que un gran porcentaje de estos pacientes mueran de un CPCNP recurrente<sup>7</sup>. Por otra parte, el análisis citológico convencional del esputo y lavado broncoalveolar asociado a *screening* radiológico de tórax no han mejorado la sobrevida global<sup>8,9</sup>. Por lo tanto, es de vital importancia la búsqueda y desarrollo de nuevos marcadores diagnósticos altamente sensibles, que permitan una detección temprana de la enfermedad, facilitando un mejor manejo de ella.

En varios cánceres humanos, incluyendo el CP, se han descrito cambios anormales en el patrón de metilación del DNA de la región promotora de varios genes importantes que controlan el funcionamiento celular normal<sup>10,11</sup>. Más de 30 genes silenciados por hipermetilación aberrante han sido estudiados, entre los que se cuentan *p16<sup>INK4α</sup>* (*p16*), *APC*, *ECAD*, *RAR-β*, *DAPK*, siendo la inactivación del gen *p16* un evento temprano y crítico en el desarrollo del CPCNP<sup>12,13</sup>. El gen *p16* es un gen supresor de tumor (GST), clave en el control del ciclo celular<sup>13</sup>. Por otra parte, la hipermetilación del gen *p16* se ha detectado en el epitelio bronquial y suero de fumadores crónicos. Puesto que dicha modificación no ha sido detectada en individuos no fumadores, se ha sugerido que algunos componentes químicos del tabaco serían importantes en la desregulación del proceso de metilación normal del DNA<sup>13-15</sup>. El propósito de este estudio fue determinar la frecuencia de inactivación de *p16* por hipermetilación de su región promotora en pacientes con CEP. Además, se pretende analizar el uso de muestras de biopsias bronquiales, incluidas en parafina, para la detección de estados de metilación de genes humanos.

## Material y Métodos

**Muestras de tejido y controles.** Treinta y cinco casos retrospectivos fueron obtenidos de

la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital del Salvador. Treinta y cuatro de ellos correspondieron a CEP y uno correspondió a una inflamación crónica de la pared bronquial. Como controles negativos se utilizó sangre periférica de 5 voluntarios sanos y tejido de biopsia bronquial de un paciente con inflamación crónica. La utilización de este grupo de muestras de archivo, fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional del Tórax.

**Extracción de DNA.** El DNA genómico total fue extraído de secciones de 20 μm de tejido incluido en parafina, siguiendo el protocolo de Coombs et al<sup>16</sup>. El DNA genómico proveniente de sangre periférica de voluntarios sanos, fue purificado utilizando el kit Wizard Genomic DNA (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el *pellet* de DNA fue lavado con etanol al 70%, resuspendido en agua libre de nucleasas y almacenado a -70 °C hasta su uso. La concentración de DNA fue calculada midiendo su OD a 260 nm. La integridad del DNA fue estimada por amplificación del gen de la β-globina. En la Tabla 1, se indican las secuencias de los partidores, la temperatura de anillamiento en el PCR y el tamaño de los amplicones obtenidos.

**Metilación de DNA control.** Se utilizó DNA de vesícula biliar como control positivo para el análisis de PCR específico para metilación (MS-PCR). Este DNA fue metilado utilizando la enzima *M.SssI* (New England Biolabs). Para ello, se utilizaron 3 μg de DNA y 3 U de la enzima con incubación a 37 °C por 1 hora.

**Modificación de DNA con Bisulfito.** El estado de hipermetilación de islas CpG de la región promotora del gen *p16* (Gene Bank accession N° X\_94154) en las muestras de DNA de los casos de CEP y DNA control fueron analizados por MS-PCR, en un DNA tratado con bisulfito de sodio como ha sido descrito por Herman et al<sup>17</sup>. Brevemente, entre 200 ng de DNA genómico purificado, diluidos en un volumen de 50 μL con agua DPC, fueron denaturados con NaOH (concentración final de 0,22 M) por 10 minutos a 37 °C. Luego, se adicionaron 30 μL de hidroquinona 10 mM (Sigma) y 520 μL de bisulfito de sodio 1,98 M pH 5,0. La mezcla se incubó por 16 horas a 50 °C. El DNA modificado fue purificado usando una resina Wizard Clean Up (Promega), precipitado con etanol, resuspendido en 30 ml de agua, y guardado a -70 °C hasta su uso. El tratamiento del DNA genómico con bisulfito de sodio, tiene por finalidad convertir las citosinas no metiladas en uracilo, los que serán convertidos a timina du-

**Tabla 1. Resumen de la secuencia de los partidores, temperatura de anillado y el tamaño del producto amplificado por PCR-MSP**

Gene	Partidor sentido (5'-3')	Partidor antisentido (5'-3')	T° de anillamiento (°C)	Tamaño Amplicón (pb)
<i>p16<sup>INK4a</sup>-E</i>	AGAAAGAGGAGGGGTTGGTTGG	ACRCCCRACCTCCTCTACC	56	193
<i>p16<sup>INK4a</sup>-I</i>	M-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	M-GACCCCGAACCGCGACCGTAA	55	150
	U-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	U-CAACCCCAAACCACAACCATAA	55	151
$\beta$ -globina	ATAGACCAATAGGCAGAGAGAGTCA	TCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGG	50	110

T° = temperatura

rante la reacción de PCR. Usando partidores específicos para secuencias metiladas y no metiladas, es posible discriminar entre estas regiones.

**PCR específico para metilación.** Para determinar el estado de metilación del gen *p16* se utilizó un set de partidores dirigidos a la región promotora y parte del exón 1<sup>17</sup>. Los partidores (Invitrogen), las temperaturas de hibridación y el tamaño del amplicón se indican en la Tabla 1. Para amplificar regiones metiladas y no metiladas se realizó un PCR-MSP anidado. Para ello, el DNA (6  $\mu$ l) modificado con bisulfito, fue amplificado utilizando los partidores *p16* externos (E). Se utilizó una mezcla de PCR con: tampón de PCR 1X (16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM de Tris pH: 8,8, 6,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-mercaptoetanol), 1,2 mM de dNTPs, 1,6 mM de cada partidor, 2,5 U de Taq Gold (AppliedBiosystem) y 5,2% DMSO, en un volumen final de 25  $\mu$ L<sup>17,18</sup>. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial 95 °C por 7 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (30 s a 95 °C, 30 s a 56 °C y 30 s a 72 °C) y una elongación final de 7 min a 72 °C. A partir del DNA amplificado en la primera ronda, se realizó una segunda amplificación utilizando un par de partidores internos (I) metilación específicos (M). Para detectar el DNA modificado no metilado se utilizó un segundo par de partidores (U), tal como se indica en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación son las mismas indicadas anteriormente. Controles sin DNA fueron incluidos en cada reacción de PCR. Los productos de PCR para el gen *p16* y el gen de la  $\beta$ -globina fueron analizados en geles de poliacrilamida al 8%, teñido con plata y en geles de agarosa al 2% con Br-Et, respectivamente.

**Análisis estadístico.** Se utilizó el programa Stata versión 6.0, empleando el método de Tau (b) de Kendall<sup>19</sup> y el test exacto de Fisher en el análisis de los datos.

## Resultados

En este estudio determinamos la frecuencia de metilación del gen *p16* en un grupo de muestras de tejido incluido en parafina proveniente de secciones tumorales y biopsias de pacientes con CEP confirmados por histología, utilizando un protocolo de MS-PCR. Dicho protocolo permite identificar y discriminar regiones metiladas en el DNA. De un total de 35 muestras de DNA provenientes de los casos clínicos en estudio, 29 contenían suficiente DNA para ser analizadas. De los resultados del MS PCR, observamos que la región promotora del gen *p16* se encontraba metilada en un 86,2 % (25/29) de los casos (Tabla 2). Los resultados del MS-PCR se muestran en la Figura 1. De este análisis, se observó que todas las muestras fueron positivas para el alelo no metilado (Figura 1). La presencia de no metilación en todas la muestras se debe probablemente a la presencia de células estromales normales y células inflamatorias presentes en el tejido tumoral. Nuestro grupo control no presentó hipermetilación del gen *p16* y todos los casos fueron positivos para el alelo no metilado (Tabla 2, Figura 1). Utilizando la prueba Tau (b) de Kendall<sup>19</sup>, se encontró una estrecha correlación entre la inactivación del gen *p16* por metilación y la presencia de CEP, con un 77% de concordancia y un  $p = 0,00005$  (Tabla 2).

Observamos una fuerte asociación entre el tabaquismo y la presencia de CEP. Veintisiete pacientes con CEP confirmaron ser fumadores crónicos, con un consumo promedio de  $22,6 \pm 10,3$  cigarrillos diarios, durante  $35,89 \pm 18,9$  años. Para estimar si el consumo de cigarrillos se asocia con un aumento en la probabilidad de desarrollar CEP, se calculó el Odds ratio de individuos expuestos y no expuestos al cigarro. A partir de dicho análisis se determinó que los individuos fumadores tienen 202,7 veces más

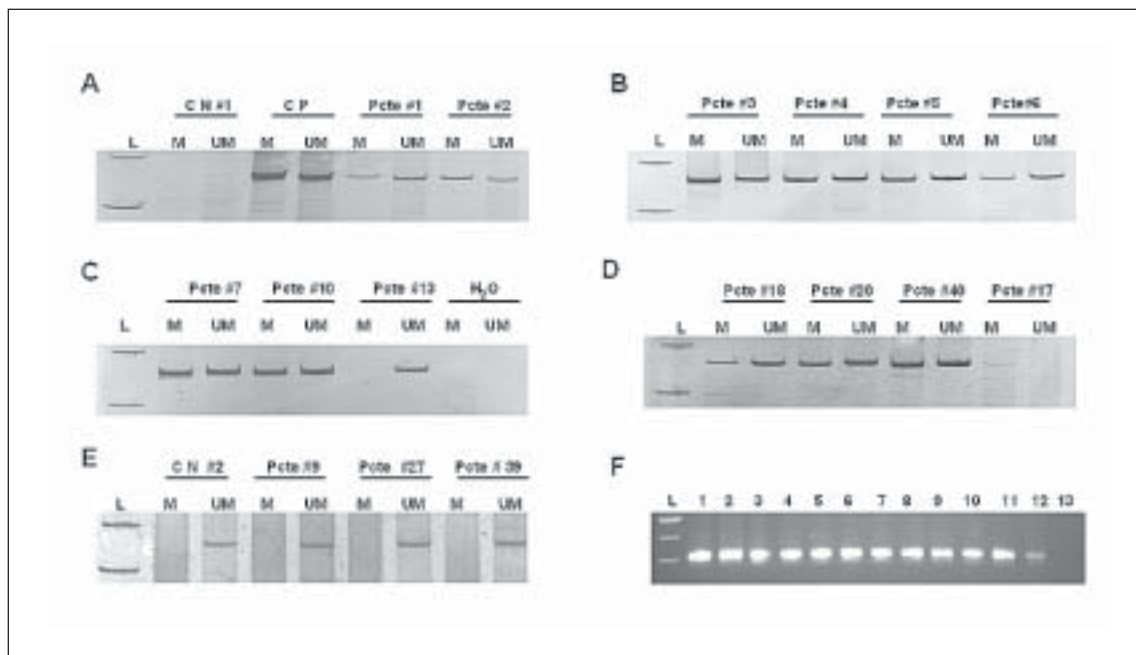
**Tabla 2. Correlación entre la metilación del gen *p16* y parámetros clínicos de casos con cáncer escamoso de pulmón**

	Casos <sup>a</sup>	Metilación (%)	P <sup>b</sup>
<b>Total</b>	29	25 (86,2)	0,00005
Genero			
- Masculino	25	21 (84,0)	
- Femenino	4	4 (100)	
Edad			
< 65	9	8 (88,9)	
65-75	16	13 (81,3)	
> 75	4	4 (100)	
Diferenciación CE*			
- Bajo	4	4 (100)	
- Moderado	15	14 (93,3)	
- Alto	8	6 (75)	
CECG*	1	1 (100)	
PBIC*	1	0 (0)	
Controles	5	0 (0)	

<sup>a</sup> Número total de pacientes y controles analizados para gen *p16*.

<sup>b</sup> P fue determinado utilizando el test exacto de Fisher en una tabla de 2 x 2

\* CE, carcinoma escamoso o epidermoide; CECG: carcinoma epidermoide de células grandes; PBIC: Pared bronquial con inflamación crónica.



**Figura 1. Análisis de metilación del gen *p16* en CEP por MS-PCR:** DNA modificado con bisulfito fue amplificado utilizando partidores específicos para alelos metilados (M) y no metilados (UM). Carril M, indica positivo para metilación, carril UM, positivo para no metilado. En A, B, C, D, E, se indican los pacientes con sus respectivos n° (Pcte #), los carriles CN #1 y CN # 2, corresponde a controles normales; CP, control positivo; H<sub>2</sub>O control sin DNA. F, amplificación de  $\beta$ -globina de muestras con CEP; L, indica el marcador de peso molecular.

**Tabla 3. Correlaciones entre el hábito tabáquico, metilación del gen *p16* y el desarrollo de cáncer escamoso de pulmón**

	CEP <sup>a</sup>		Metilación <sup>b,c</sup>	
	+	-	+	-
<b>Fumadores</b>	27 (100%)	0 (0%)	19 (86,4%)	3 (13,6%)
<b>No Fumador</b>	1 (16,7%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)

<sup>a</sup> El riesgo de desarrollar CEP fue mayor para el grupo de fumadores con un OR de 201 con un 95% de IC (7,18-5.593).

<sup>b</sup> El riesgo de inactivación de *p16* por metilación fue mayor para el grupo de fumadores con un OR de 2,6 con un 95% de IC (1-373).

<sup>c</sup> Se obtuvo un  $p = 0,003$  con un coeficiente de correlación de un 63,3%.

riesgo de desarrollar CEP, que los no fumadores (OR, 201,7; 95% IC, 7,18-5.593), como se indica en la Tabla 3. Del grupo de individuos que confirmaron su hábito tabáquico, solamente en 22 muestras de DNA fueron suficientes para realizar el PCR-MSP de *p16*, determinándose que un 86,4% fueron positivas para la metilación del gen *p16* (Tabla 3).

## Discusión

Varios estudios han demostrado que existen una serie de alteraciones genéticas presentes en CP, como mutación de *p53*, pérdida de heterocigocidad y metilación aberrante del gen *p16*<sup>20</sup>. Nuestros datos demuestran que la metilación aberrante del gen *p16* es frecuente en CEP, con un 86,2% de metilación en el grupo estudiado. Se han descritos porcentajes menores de metilación en el gen *p16*, sin embargo, las muestras utilizadas han correspondido a distintos tipos de CPCNP (adenocarcinomas, carcinomas adenoescamoso o carcinoma de células grandes) y las etapas del CP en estos pacientes han sido diferentes<sup>20</sup>. En nuestro estudio, todas las muestras utilizadas correspondieron a CEP, tipo histológico asociado a hipermetilación.

Encontramos una fuerte asociación entre el hábito tabáquico y el desarrollo de CEP, 27 pacientes fumadores crónicos desarrollaron CEP. Un paciente de 39 años indicó no ser fumador y desarrolló CEP, sin embargo, desconocemos si este individuo estuvo expuesto durante su vida al humo del cigarrillo u carcinógenos ambientales. Una limitante del estudio fue no disponer de un grupo control pareado por edad y sexo con el grupo en estudio. La edad promedio de los controles fue de 33 años y eran no fumadores. A pesar de esta limitante, los datos indican que los individuos fumadores tienen un mayor ries-

go de padecer CEP. Junto a estos datos, la presencia de inactivación del gen *p16* por metilación también parece estar estrechamente relacionada con el hábito tabáquico o exposición a una fuente cancerígena. El silenciamiento génico por metilación de los genes *p16* y *RAR-β* inducido por el humo de tabaco, ha sido demostrado en ratas expuestas al compuesto 4-metilnitrosamino-1-(3 piridil)-butanona (NNK), presente en el tabaco<sup>21</sup>. En células exfoliadas de esputo de individuos fumadores portadores de CP, también fue posible observar un alto porcentaje de metilación del gen *p16*<sup>14,23</sup>. En nuestro grupo de estudio, un alto porcentaje de los pacientes eran fumadores crónicos con un consumo promedio diario de 22 cigarrillos por sobre 20 años. Esta observación es muy importante, puesto que eventos tempranos en la transformación pre-neoplásica pudiesen ser reflejados en el estado de metilación de células presentes en el tracto respiratorio de los fumadores crónicos. En los últimos años el consumo de tabaco en la población juvenil chilena ha aumentado a cifras alarmantes. Estudios en la población escolar entre 1995 y 1999 mostraron una situación de consumo-año de un 56% aproximadamente y la mayor prevalencia de consumo en ambos sexos se produjo entre los 20 y 44 años de edad<sup>22</sup>.

En conclusión, nosotros hemos demostrado que la metilación aberrante del gen *p16* sería un evento frecuente en CEP. Además, determinamos que individuos fumadores tienen mayor riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. Por otra parte, se determinó que la metilación de genes del tipo GST, como el gen *p16*, pueden ser utilizados como biomarcadores para la detección temprana de CEP en muestras de biopsias bronquiales de pacientes con sospecha clínica de CEP. Además, proponemos el uso de esta

metodología altamente sensible para la detección temprana de CEP en muestras como suero, plasma o esputo.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen a la Dra. María Capetillo por la donación de muestras de archivo y a la Bioquímica Virginia Monardes por su ayuda en la recopilación de datos clínicos de los pacientes en estudio.

## Bibliografía

- 1.- PISANI P, PARKIN D M, BRAY F, FERLAY J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29. Erratum in: *Int J Cancer* 1999; 83: 870-3.
- 2.- GREENLEE R T, HILL-HARMON M B, MURRAY T, THUN M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, 2001; 51: 15-36.
- 3.- MEDINA E, KAEMPFER A M. Mortalidad por cáncer en Chile: consideraciones epidemiológicas. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 1195-202.
- 4.- MINSAL, Programa Nacional de cáncer ([www.minsal.cl](http://www.minsal.cl)), estadísticas 2004.
- 5.- WISTUBA I I, MAO L, GAZDAR A F. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* 2002; 21: 7298-306.
- 6.- SHIELDS P G. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* 2002; 21: 6870-6.
- 7.- NARUKE T, GOYA T, TSUCHIYA R, SUEMASU K. Prognosis and survival in resected lung carcinoma based on the new international staging system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 96: 440-7. Erratum in: *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 97: 350.
- 8.- BERLIN N I, BUNCHEER C R, FONTANA R S, FROST J K, MELAMED M R. The National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Detection Program. Results of the initial screen (prevalence). Early lung cancer detection: introduction. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 545-9.
- 9.- TOCKMAN M S. Survival and mortality from lung cancer in a screened population. *Chest* 1986; 89: 324S-325S.
- 10.- HERMAN J G, BAYLIN S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-54.
- 11.- ESTELLER M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21: 5427-40.
- 12.- NUOVO G J, PLAIA T W, BELINSKY S A, BAYLIN S B, HERMAN J G. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 12754-9.
- 13.- BELINSKY S A, NIKULA K J, PALMISANO W A, MICHELS R, SACCOMANNO G, GABRIELSON E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11891-6.
- 14.- BELINSKY S A, PALMISANO W A, GILLILAND F D, CROOKS L A, DIVINE K K, WINTERS S A, et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res* 2002; 62: 2370-7.
- 15.- PALMISANO W A, DIVINE K K, SACCOMANNO G, GILLILAND F D, BAYLIN S B, HERMAN J G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60: 5954-8.
- 16.- COOMBS N J, GOUGH A C, PRIMROSE J N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27: e12.
- 17.- HERMAN J C, GRAFF J R, MYÖHÄNEN S, NELKIN B D, BAYLIN S B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
- 18.- FAN X, INDA M M, TUÑON T, CASTRESANA J S. Improvement of the methylation specific PCR technical conditions for the detection of p16 promoter hypermethylation in small amounts of tumor DNA. *Oncol Rep* 2002; 9:181-3.
- 19.- NAVARRO-FIERRRO R. Introducción a la bioestadística. Análisis de variables binarias. 1987, Mc Graw-Hill, México.
- 20.- ZOCHBAUER-MULLER S, FONG K M, VIRMANI A K, GERADTS J, GAZDAR A F, MINNA J. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001; 61: 249-55.
- 21.- VUILLEMENOT B R, PULLING L C, PALMISANO W A, HUTT J A, BELINSKY S A. Carcinogen exposure differentially modulates RAR-beta promoter hypermethylation, an early and frequent event in mouse lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 623-9.
- 22.- Estudio del Consumo de Drogas en Población Escolar de Chile, a nivel Comunal. Informe Final. Consejo Nacional para el Control de Estupefacientes (CONACE), Ministerio de Educación, Ministerio de Salud. Gobierno de Chile, 1999.

---

Correspondencia a: Dra. Leda Guzmán M.  
Sección Inmunodiagnóstico.  
Instituto de Salud Pública de Chile  
Avda. Marathon 1000, Ñuñoa.  
Santiago-Chile  
E-mail: [lguzman@ispch.cl](mailto:lguzman@ispch.cl)