



Cirugía y Cirujanos

ISSN: 0009-7411

cirugiaycirujanos@prodigy.net.mx

Academia Mexicana de Cirugía, A.C.

México

Arch-Tirado, Emilio; Verduzco-Mendoza, Antonio; Azuara-Pliego, Enrique; Hernández-Orozco, Francisco; Collado-Corona, Miguel Ángel

Utilidad del cobayo como modelo de estudios audiológicos y propuesta de accesos quirúrgicos al oído y cuello

Cirugía y Cirujanos, vol. 73, núm. 5, septiembre-octubre, 2005, pp. 339-344

Academia Mexicana de Cirugía, A.C.

Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=66273503>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Utilidad del cobayo como modelo de estudios audiológicos y propuesta de accesos quirúrgicos al oído y cuello

Acad. Dr. Emilio Arch-Tirado,* MVZ Antonio Verduzco-Mendoza,* Acad. Dr. Enrique Azuara-Pliego,* Acad. Dr. Francisco Hernández-Orozco*, Acad. Dr. Miguel Ángel Collado-Corona*

Resumen

Se discute la utilidad del cobayo en la investigación audiológica y se describen los diferentes accesos quirúrgicos a oído medio y oído interno, con el objeto de utilizar estas técnicas para la producción de hipoacusias experimentales, además de describir una técnica quirúrgica para denervación laringea. Por último, se discute sobre los registros de potenciales evocados auditivos obtenidos en animales recién nacidos y adultos, a los cuales con la finalidad de sustentar el uso del cobayo como modelo ideal de estudios audiológicos y de cirugía de cuello, se les produjo hipoacusia experimental.

Palabras clave: modelos quirúrgicos, oído, laringe, cobayo.

Summary

We discuss the utility of the guinea pig model in audiology research and describe the different surgical accesses to the middle and inner ear in order to use these techniques for the production of experimental deafness. In addition, we describe a surgical technique for laryngeal denervation. Finally, we discuss the auditory-evoked potentials obtained in newborn and mature animals, in whom experimental deafness was produced. Our purpose was to confirm the use of the Guinea pig as an ideal model for audiologic studies and for neck surgery.

Key words: Surgical models, ear, larynx, Guinea pig.

Introducción

El objetivo del presente trabajo es proponer al cobayo (*Cavia porcellus*) como un modelo ideal para estudio audiológico y de cirugía de cuello, debido a las características anatomo-fisiológicas del órgano auditivo y su utilidad en la investigación audiológica.

Los cobayos son miembros de una gran familia de roedores; los populares conejillos de Indias en hábitat natural viven en camadas de cinco a cuarenta miembros, se ocultan en madrigueras excavadas por ellos mismos y su máxima actividad es nocturna.

El cobayo fue introducido en Europa por los españoles a mediados del siglo XVI y es probable que en el imperio inca hayan sido domesticados (1456). Fue utilizado por primera vez para estudios de laboratorio en el siglo XIX, ya que tienen

una rápida adaptación a los laboratorios y es un animal sociable y fácilmente manejable.¹ Ha sido utilizado en todo tipo de investigaciones biomédicas, y según *Home Office Static of Experiments on Living Animals Great Britain 1985* es el decimoquinto de los animales que más se usa en el laboratorio después de ratones, ratas, conejos y pájaros. Se utiliza básicamente en estudios inmunológicos, bioquímicos, toxicológicos, farmacológicos y de anafilaxis, así como en estudios de anatomía y fisiología de varios órganos.²

Utilización del cobayo en estudios audiológicos

El cobayo resulta ser un modelo ideal para estudios audiológicos, ya que las dimensiones de la membrana timpánica y del oído medio son grandes, por lo que el abordaje quirúrgico es relativamente fácil y se puede realizar por el oído externo, el oído medio o el oído interno, con mínima pérdida de sangre y baja mortalidad. Cuando se realiza la incisión retroauricular se encuentra la bula timpánica y al fracturarla se visualiza la ventana redonda, el epítímpano y la cadena osicular, con la membrana timpánica intacta. Con una incisión inferior por la mejilla se encuentra fácilmente la cóclea, la trompa de Eustaquio, los canales semicirculares (horizontal y posterior), la membrana

* Instituto Nacional de Rehabilitación-Comunicación Humana.

Solicitud de sobretiros:

Acad. Dr. Emilio Arch-Tirado,
Instituto Nacional de Rehabilitación,
E-mail: arch@infosel.net.mx.

Recibido para publicación: 09-03-2005

Aceptado para publicación: 06-05-2005

timpánica y los osículos.³ También se reporta el abordaje por vía submaxilar y suprameatal. Para abordar al oído medio, la vía submaxilar comienza con una incisión de 30 mm por dentro y paralela al borde inferior de la mandíbula; se identifican el músculo masetero, la glándula salival, el timo, el vientre posterior del músculo digástrico y aparece la bula timpánica. En la vía suprameatal se utiliza una incisión horizontal supraauricular de 15 mm, que tras disecar el músculo temporal permite acceder a la pared externa del epítímano.⁴

Se puede mencionar que el hueso temporal y las estructuras auditivas del cobayo son buenos modelos del oído humano. Ya que el órgano auditivo del cobayo puede ser manejado con gran facilidad para estudios experimentales, las características histológicas de la mucosa del oído medio son importantes, añadiéndole las estructuras del oído medio.⁵

Se realizó una búsqueda documental en la base de datos Medline de las investigaciones que habían utilizado al cobayo con fines audiológicos entre 1968 y 1999, con los siguientes resultados: de 195 artículos en donde el cobayo fue fundamental, 15 estaban relacionados con el oído medio, básicamente membrana timpánica, trompa de Eustaquio y cadena osicular; 151 trabajos estaban abocados al oído interno, vestíbulo, órgano de Corti, nervio auditivo, corteza cerebral y audición, laberinto, células cocleares, conductos semicirculares, respuestas a sonidos, selección de frecuencias, ototóxicos, perilinfa y endolinfa, bioquímica, intensidad de frecuencias, ventana oval, ventana redonda y trauma acústico; 29 trabajos estaban relacionados con audición: conducta y sonido, dimorfismo sexual y patrones auditivos, potenciales provocados auditivos de tallo cerebral, producción de hipoacusias quirúrgicas, técnicas de microscopía y provocación de hipoacusias por trauma acústico.

También se realizó una revisión bibliográfica en la revista de la Sociedad Mexicana de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello, para leer los trabajos de investigación en donde se utilizaron cobayos en trabajos experimentales, encontrando cuatro trabajos de 1956 a la fecha: en 1956, Elvira Estrada con "Alteraciones etiológicas post mortem en el oído del cuyo"; en 1962 y 1963, Consuelo Savín con "Lesiones cocleares experimentales con antibióticos" y "Caracteres morfológicos de los vasos del oído interno"; en 1969, Islas con "Datos experimentales sobre el transporte iónico entre la endo y perilinfa".⁶⁻⁹

Audición en cobayos

La sensibilidad del oído del cobayo y el rango de frecuencias que circunda es el prototipo de los mamíferos, ya que percibe sonidos audibles y ultrasónicos, la sensibilidad máxima está entre 4 y 8 kHz en baja frecuencia y en la frecuencia alta se extiende hasta 60 kHz. El cobayo discrimina tonos de 12 Hz a 500 Hz, 50 Hz a 1000 Hz y 600 Hz a 10 000 Hz.

Los cobayos pueden discriminar diferencias de 3 db entre un estímulo de intensidad moderada sobre muchos de sus rangos de frecuencia.¹⁰

En otros estudios se menciona que los campos auditivos de la corteza indican que los cobayos tienen la capacidad de discriminar frecuencias altas de 16 000 a 32 000 Hz y frecuencias bajas de 500 a 2 800 Hz.¹¹

Potenciales provocados auditivos de tallo cerebral en cobayos

Los cambios en la morfología y la aparición de las ondas de los potenciales provocados auditivos de tallo cerebral (PPATC) están de acuerdo con la maduración y desarrollo de los mamíferos, como resultado de la eficiencia en la transmisión de las diferentes sinapsis que conforman los núcleos de la vía auditiva en el tallo cerebral y de los cambios en el número y sincronización de la descarga neural a través de las sinapsis. Estos factores también inciden en la reducción de las latencias de las ondas de los PPATC.

De una manera muy simple se puede decir que el desarrollo de los PPATC en los mamíferos representa la activación secuencial de los núcleos del tallo cerebral y el orden en el que cada onda aparece, lo cual es registrado como índice del desarrollo y la maduración progresiva del tallo cerebral.¹²

Al disminuir la intensidad del estímulo desaparecen algunas de las ondas. La primera onda en desaparecer es la onda VII, lo que sucede a los 60 db de intensidad. Las ondas I, II, III y IV pueden identificarse en la mayor parte de los casos hasta los 20 db; la onda IV es la última en desaparecer, a los 10 db, y nos indica el probable umbral objetivo de la audición del animal. La onda I se genera en el nervio coclear, la onda II en los núcleos cocleares bulbares, la onda III en el complejo olivar superior, la onda IV en los núcleos del lemnisco lateral, la onda V en el colículo inferior, las ondas VI y VII tendrían una menor significación, apareciendo de manera más irregular (todo orienta a pensar que son generadas en el cuerpo geniculado medial).¹³

Acceso quirúrgico a oído y registros electrofisiológicos en cobayos

En el Laboratorio de Fisiología del Instituto de la Comunicación Humana se han registrado potenciales provocados auditivos en cobayos cuatro horas después del nacimiento, con una excelente respuesta y umbral auditivo a 10 db. Si bien Roquette menciona que a los 10 db sólo aparece la onda IV, en nuestros registros aparecen todas con las siguientes latencias: la onda I, con 2 milisegundos; la onda II, con 2.9 milisegundos; la onda III, con 3.6 milisegundos, y la onda IV, con 4.5 milisegundos.¹⁴

En el Laboratorio de Cirugía Experimental se utilizan dos abordajes distintos:

1. *Técnica I.* Consiste en realizar una incisión retroauricular, debridar la bula timpánica, fracturarla, localizar la cóclea y destruirla; esta técnica se utiliza para provocar hipoacusias por extracción de la cadena osicular (ya que se identifica perfectamente la membrana timpánica y la cadena osicular) en animales adultos.
2. *Técnica II.* La vía es intratimpánica y consiste en un abordaje por el meato auditivo externo, para localizar la membrana timpánica y la cóclea con destrucción de las mismas. En esta técnica no se requiere sutura ya que se utiliza el bisturí sólo para realizar una pequeña incisión en el meato auditivo externo, y todo el procedimiento quirúrgico se realiza a través del meato auditivo externo y la cavidad timpánica.

Por su parte, Nabil describe las características anatómicas del hueso temporal en el cobayo, resaltando el gran tamaño de la bula y el de la membrana timpánica comparados con los presentados por el humano. Asarch propone la vía retroauricular como la más viable para el abordaje al oído medio y el abordaje por el cuello para localizar el oído interno. Gil Carcedo propone la vía submandibular para accesar el oído medio e interno.

Las vías de acceso al oído medio o al oído interno reportadas en la literatura son de poca o nula aplicación en cobayos recién nacidos ya que la manipulación quirúrgica es alta, en comparación con la vía que proponemos para la producción de hipoacusias en animales recién nacidos, ya que esta técnica no sólo es de baja manipulación quirúrgica sino también requiere menos tiempo de realización.

Técnicas quirúrgicas

1. *Animales:* para la técnica I (extracción de la cadena osicular) se utilizaron 10 animales adultos de 450 a 900 g de peso y 10 animales recién nacidos. Para la técnica II (destrucción de la cóclea) se utilizaron 10 animales recién nacidos. Todos los animales fueron alojados en el bioriterio del Instituto Nacional de Rehabilitación. Todos los animales fueron manejados y alojados bajo la Norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).
2. *Condición:* animales pigmentados por los posibles daños congénitos de los animales albinos por deficiencia de melanocitos.¹⁵⁻²¹
3. *Alimentación y alojamiento:* jaulas de plástico 70 x 50 x 33 cm, con cama de pino compacto y deshidratado, alimento comercial especial para cuyos (*Guinea Pig Diet 5025*) *ad libitum*, complementando la dieta con col y agua corriente.
4. *Anestesia:* ketamina base 100 mg/ml, 70 mg/kg de peso.
5. *Cirugía:* retroauricular y por vía intratimpánica, en el Laboratorio de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de

Rehabilitación con equipo de disección otológica y microscopio estereoscópico quirúrgico Carl Zeiss.

6. *Pruebas:* potenciales provocados auditivos de tallo cerebral después de la cirugía y una semana después, con equipo Racia AP78, efectuando un barrido de 110 a 30 db.

Antes y después de provocar daños en la cadena osicular (animales adultos) y en la cóclea (animales recién nacidos) se procedió a efectuar registros electrofisiológicos (potenciales evocados auditivos de tallo cerebral) después de la cirugía y a una semana de la operación.

En los animales a quienes se les extrajo la cadena osicular (técnica I), se encontró respuesta a los 50, 70 y 90 db de estímulo (cuadro I), encontrándose alteraciones en la morfología, amplitud y latencia de los PEATC, con una mortalidad de 0 % en animales adultos y de 20 % en animales recién nacidos (cuadro I y figura 1).

En los animales recién nacidos a los cuales se les destruyó la cóclea (técnica II) no se encontró respuesta a los 110 db, lo que demuestra la efectividad de la técnica quirúrgica (destrucción de la cóclea por vía intratimpánica); no hubo mortalidad (cuadro I y figura 1).

Denervación laríngea

Animales: para esta técnica se utilizaron 10 cobayos adultos de 450 a 900 g de peso.

Alimentación y alojamiento: jaulas de plástico 70 x 50 x 33 cm, con cama de pino compacto y deshidratado, alimento comercial especial para cuyos (*Guinea Pig Diet 5025*) *ad libitum*, complementando la dieta con col y agua corriente. Los animales fueron alojados en el Bioriterio del Centro Nacional de Rehabilitación. Los ciclos de luz y oscuridad fueron regulados, la temperatura de 22 ± 1 °C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los animales en investigación vivían con la madre y compañeros de camada en la misma jaula.

Procedimiento quirúrgico. Se utilizó anestesia disociativa, clorhidrato de ketamina 70 mg/kg e hidrocloruro de xilazina 0.5 mg/kg.

Se utilizó un microscopio quirúrgico Carl-Zeiss 6615, con aumento de 16 x.

Los animales fueron rasurados en el área del cuello y embrocados con cloruro de benzalconio.

Localización del nervio laríngeo inferior (recurrente)

Se colocó al animal en posición supina en la mesa quirúrgica y se le realizó una incisión en la región ventral sobre la línea media a la altura del cuello, incidiendo los planos cutáneo y

Cuadro I. Potenciales provocados auditivos de tallo vertebral en cobayos sin cadena osicular, sin cadena osicular y cóclea, y normooyentes

Estímulo	Extracción de la cadena osicular	Destrucción de la cadena osicular y cóclea	Oído normal
50 decibeles	Onda II 2.92 ± 0.75	Onda II sin respuesta	Onda I 1.6 ± 0.03
	Onda III 4 ± 0.78	Onda III sin respuesta	Onda II 2.7 ± 0.02
	Onda IV 4.25 ± 0.07	Onda IV sin respuesta	Onda III 3.6 ± 0.03
	Onda I sin respuesta	Onda I sin respuesta	Onda IV 4.5 ± 0.02
70 decibeles	Onda II 2.48 ± 0.83	Onda II sin respuesta	Onda I 1.71 ± 0.41
	Onda III 3.45 ± 0.69	Onda III sin respuesta	Onda II 2.72 ± 0.56
	Onda IV 4.02 ± 0.38	Onda IV sin respuesta	Onda III 3.46 ± 0.8
	Onda I sin respuesta	Onda I sin respuesta	Onda IV 4.42 ± 1.23
90 decibeles	Onda II 2.28 ± 0.47	Onda II sin respuesta	Onda I 2.8 ± 0.07
	Onda III 3.32 ± 0.66	Onda III sin respuesta	Onda II 3.7 ± 1.65
	Onda IV $4.1 \pm .97$	Onda IV sin respuesta	Onda III 4.06 ± 1.63
	Onda I sin respuesta	Onda I sin respuesta	Onda IV 4.26 ± 1.7

Promedio de las latencias y sus desviaciones estándar

subcutáneo hasta localizar el timo, desplazándolo de manera lateral para identificar los músculos esternohioideo y esternotiroideo, los cuales a su vez fueron desplazados lateralmente, exponiendo las astas inferiores del cartílago tiroides y el trayecto de la arteria carótida y de los nervios laríngeos inferiores, los cuales fueron disectados de tejidos aledaños con una pinza de caimán y sujetados con una pinza de disección para posteriormente seccionar uno o dos centímetros antes de que se introdujera a la estructura laríngea, ya que los nervios laríngeos inferiores se localizan paralelos y unidos al cartílago tiroides (figura 2). La finalidad de cortar uno o dos centímetros fue evitar la formación de anastomosis.²²

Localización del nervio laríngeo superior

Para su localización se utiliza el mismo procedimiento que para el nervio laríngeo inferior, pero una vez localizadas las astas inferiores del cartílago tiroides se procede a diseccionar con una pinza de caimán el músculo cricotiroideo para localizar el nervio laríngeo superior que se encuentra en posición interna de este músculo y así identificar las ramas interna y externa, para realizar la neurorrafia.

Todos los estudios fueron realizados bajo el reglamento para el uso y cuidado de los animales de laboratorio.²³

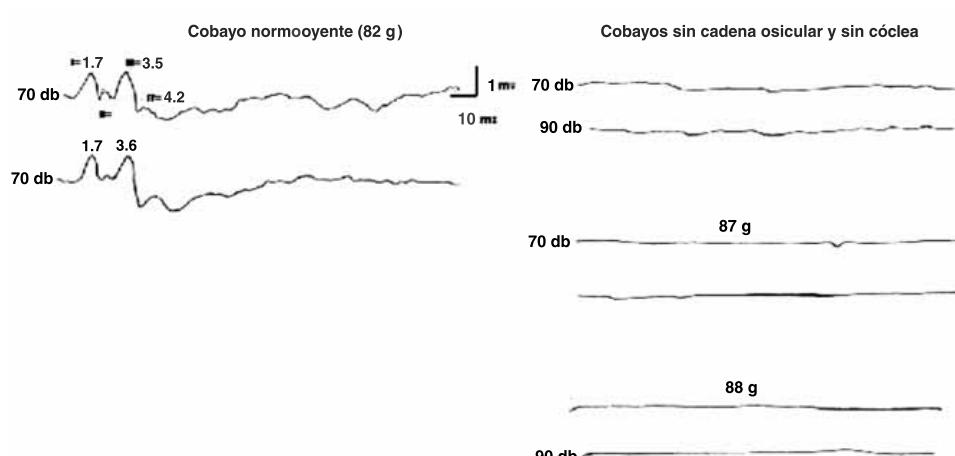


Figura 1. Resultados de los potenciales evocados auditivos de tallo cerebral en cobayos normooyentes y con destrucción de la cóclea.

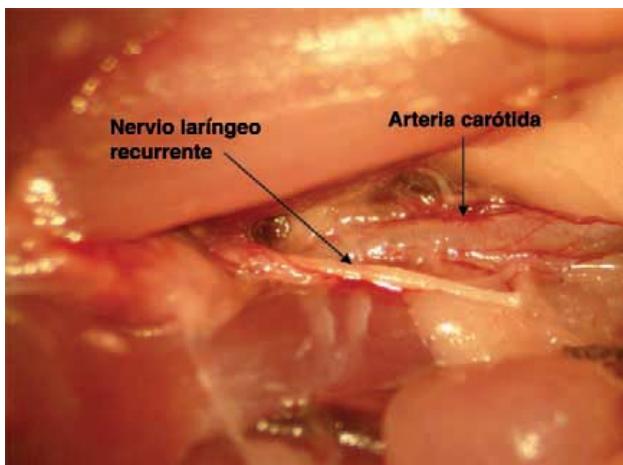


Figura 2. Se observa el trayecto del nervio laríngeo recurrente y estructuras adyacentes.

Conclusiones

El oído medio en los cobayos es grande en comparación con otros animales utilizados en la investigación, esta característica facilita el acceso quirúrgico por diferentes vías, retroauricular, submaxilar e intratimpánica, y de esta manera se puede acceder al oído interno sin complicaciones y sin pérdida significativa de sangre.

Nuestra técnica quirúrgica intratimpánica para la extracción de la cadena osicular en animales recién nacidos es de fácil realización y cero mortalidad; este procedimiento quirúrgico no es citado en la literatura.

La estructura del meato auditivo externo en el cobayo tiene un acceso sencillo sin utilizar el otoscopio, lo cual facilita la pronta localización de la membrana timpánica.

Uno de los aspectos fisiológicos en los cobayos es que nacen con maduración completa del sistema nervioso central, en comparación con otros roedores o animales utilizados en la investigación, lo cual facilita los estudios audiológicos en animales recién nacidos, ya que la vía auditiva desde el nacimiento es totalmente funcional.

Respecto a los registros electrofisiológicos, en los animales a los que se les extrajo la cadena osicular se encontró respuesta a 50, 70 y 90 db, con desaparición de la onda I, la cual es producida por la actividad del nervio acústico.

En los animales normooyentes cuando el estímulo fue de 90 db, se aumenta la latencia de la onda en comparación con los estímulos de 50 y 70 db, debido a la sensibilidad del oído del cobayo en comparación con el del ser humano, por tener una mayor cantidad de células receptoras en el oído interno, que actúan como una protección a estímulos de alta intensidad.

Como se puede observar en el cuadro I, en los animales que se les extrajo la cadena osicular, al estimular a 50 y 70 db

aumenta la latencia en las tres ondas que permanecen, en comparación con los animales normooyentes. El aumento en la amplitud de la onda se debe a una respuesta tardía en comparación con los normooyentes, corroborándose una hipacusia sensorial.

Los PPATC en cobayos están constituidos por siete ondas, de las cuales las cuatro primeras son fundamentales para el estudio de la audición en esta especie, y aparecen en los 10 milisegundos siguientes a una estimulación sonora y cuyas latencias y amplitudes guardan una estrecha correlación con la intensidad del estímulo, variando dentro de estrechos márgenes.

Se propone al cobayo como un modelo de estudio laringológico, ya que su morfología es parecida a la del ser humano y por la gran riqueza de vocalizaciones que presenta esta especie desde el nacimiento, la cual apoya la utilización del modelo. Nuestros resultados fortalecen los trabajos que proponen al cobayo como modelo de estudios audiológicos y foniátricos.¹⁴

Referencias

1. Mannity AH. Cobayos. Argentina: Ed. Albatros;1976. pp. 1-6.
2. Banixs R. The Guinea Pig (Biology, Care, Identification, Nomenclature, Breeding and Genetics). USAMRIID Seminar Series;1989. pp. 10-17.
3. Nebil G, et al. Anatomy of the Guinea pig temporal bone. Ann Otorhinol Laringol 1992;101:699-704.
4. Gil-Carcedo LM, Martin MC, Carranza MA, Benito JI. Abordaje quirúrgico del oído medio del cobayo. Acta Otorrinolaringol Esp 1991;42(5):399-403.
5. Asarch R, Abramson M, Litton Word B. Surgical anatomy of the Guinea pig ear. Ann Otol 1975;84:250-255.
6. Estrada E. Alteraciones etiológicas post-mortem en el oído del cuyo. An Soc Mex Otorrinolaringol 1956;30:31-35.
7. Savin C. Lesiones cocleares experimentales con antibióticos. An Soc Mex Otorrinolaringol 1962;9(2-3):101-107.
8. Savin C. Caracteres morfológicas de los vasos del oído Interno. An Soc Mex Otorrinolaringol 1983;6(2):61-69.
9. Islas S. Datos experimentales sobre el transporte iónico entre la endo y perilynfa. An Soc Mex Otorrinolaringol 1969;12(1-3):39-49.
10. Stebbins WC. The Acoustic Sense of Animals. Cambridge, MA: Harvard University Press;1983. pp. 92-94.
11. Redies H, Sieben U, Creutzfeldt OD. Functional subdivisions in the auditory cortex of the Guinea pig. J Comp Neurol 1989;282(4):473-488.
12. Hernández-Orozco F, Flores T, Peñalosa Y. Registros electrofisiológicos para el diagnóstico de la patología de la comunicación humana. México: Instituto Nacional de la Comunicación Humana; 1997. pp. 231-242.
13. Roquette GJ, Gil SM, Danino GG. Potenciales auditivos evocados del tronco cerebral en el cobayo. An ORL Iber-Am 1982;IX:371-382.
14. Arch-Tirado E, McCowan B, Saltijeral-Oaxaca J, Zarco-de Coronado I, Licona-Bonilla J. Development of isolation-induced vocal behavior in normal hearing and deafened Guinea pig infants. J Speech Lang Hear Res 2000;43(2):432-440.
15. Famula TR, Oberbauer AM, Sousa CA. A threshold model analysis of deafness in dalmatians. Mamm Genome 1996;7:650-653.

16. Holliday TA, Nelson HJ, Williams DC, Willits N. Unilateral and bilateral brainstem auditory-evoked responses abnormalities in 900 dalmatian dogs. *J Vet Intern Med* 1992;6:166-174.
17. Luttgen PJ. Deafness in the dog and cat. *Vet Clin North Am* 1994; 24:981-989.
18. Montes-de Oca FE, Saul A, Escalante UC, Poblano A, Lagunes R. El vitíligo y la audición. *An Otorrinolaringol Mex* 1990;35:279-281.
19. Schrott A, Spoendlin H. Pigment anomaly associated inner ear deafness. *Acta Otolaryngol (Stockholm)* 1987;103:451-457.
20. Strain GM, Kearney MT, Gingac II, Levesque DC, Nelson HJ, Tedford BC, Remsen LG. Brainstem auditory-evoked potential assessment of congenital deafness in dalmatians: associations with phenotypic markers. *J Vet Intern Med* 1992;5:182.
21. Collado-Corona M, Mora-Magama I, Cordero GL, Toral-Martíñon R, Shkurovich-Zaslavsky M, Uiz-García M, González-Astiazaran A. Transcranial magnetic stimulation and acoustic trauma or hearing loss in children. *Neurol Res* 2001;23:343-346.
22. Yoshida Y, Tanaka Y, Saito T, Shimazaki T, Hirano M. Peripheral nervous system in the larynx. *Folia Phoniatr (Basel)* 1992;44:194-219.
23. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Institute of Laboratory Animal Resources 1996. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina.