

INDICADORES MORFOMÉTRICOS DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES EN PACIENTES DE LA PROVINCIA HOLGUÍN.

Autores:

Deimarys Toledo Hidalgo ¹, Pedro A. Díaz Rojas ², Yamila Oro Pozo³

¹ Especialidad: Histología, Departamento: Ciencias Básicas.

² Especialidad: Histología, Departamento: Ciencias Básicas.

³ Especialidad: Histología, Departamento: Ciencias Básicas.

Universidad: Ciencias Médicas

Facultad de Ciencias Médicas: Mariana Grajales Coello.

Provincia: Holguín.

País: Cuba.

e-mail: deimarys@infomed.sld.cu

RESUMEN

La tiroides es donde con más frecuencia se originan enfermedades tumorales de naturaleza endocrina maligna. A este antecedente se suman las múltiples variantes histológicas que posee esta entidad, que en ocasiones son motivo de importantes dudas diagnósticas. Por esta razón, se desarrollan estudios en los que cada vez más se añaden procedimientos morfométricos.

Se reconoce que el éxito de un tratamiento individualizado depende de un diagnóstico preciso, donde la morfometría, al descartar la

subjetividad en el diagnóstico se convierte en una herramienta de mucho valor. A pesar de esto, en nuestra provincia no existen indicadores morfométricos que caractericen las enfermedades tumorales de la tiroides, por lo que se plantea ¿Qué indicadores morfométricos caracterizan al Carcinoma Papilar de Tiroides en nuestra provincia?

Para establecer los indicadores morfométricos del carcinoma papilar de tiroides en nuestra provincia, se realizó un estudio morfométrico de serie de casos con 12 pacientes con este diagnóstico **histopatológico, atendidos en el Hospital Provincial Universitario "V I. Lenin"**.

Se caracterizaron indicadores morfométricos nucleares del carcinoma papilar de tiroides como el área y el volumen. Se concluyó que el área y el volumen nuclear poseen valores altos comparados con los valores que se observan en enfermedades nodulares benignas lo que puede contribuir a su diagnóstico histopatológico.

Palabras claves: Tiroides, carcinoma papilar de tiroides, morfometría.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de naturaleza tumoral maligna, de manera general, constituyen la segunda causa de muerte en el mundo, en Cuba y en nuestra provincia y solo es superado por las enfermedades cardiovasculares. A pesar de que solo el uno por ciento está representado por las tumoraciones de naturaleza endocrina las tumoraciones malignas de la tiroides son las de mayor incidencia.¹⁻²

Su comportamiento y evolución dependen de las células que les dan origen y de su diferenciación celular. El carcinoma papilar de tiroides (CPT) marca la vanguardia con un 80 por ciento de los casos. Es más frecuente en el sexo femenino y se presenta entre la tercera y cuarta década de la vida con tasas de incidencia cada vez más altas.²⁻³

La tendencia actual es garantizar el tratamiento más eficaz y menos deletéreo para el paciente, individualizando el enfoque terapéutico considerando cuál es el tipo histológico y el riesgo de recurrencia,

para determinar qué pacientes se beneficiarán de una terapia más agresiva y cuáles podrán ser tratados con un enfoque más conservador, teniendo en cuenta sus ventajas, y es aquí donde la morfometría entra a jugar un papel fundamental, ya que a través de ella podemos cuantificar una serie de parámetros celulares que confieren mayor precisión al estudio anatomopatológico y así, con esta herramienta, ser más precisos en el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de las variadas enfermedades oncológicas.⁴⁻⁶

Algunos autores se han dedicado a la aplicación de la morfometría para validar su importancia en el diagnóstico más preciso de la patología tumoral tiroidea. Otros se han dedicado a establecer estos indicadores en las diferentes variedades tumorales de la tiroides, en el ámbito nacional e internacional y han usado la morfometría para la caracterización del factor de forma y el volumen nuclear entre otros indicadores morfométricos para la evaluación de las lesiones tumorales.⁷⁻¹²

Sin embargo, el uso del análisis morfométrico en patologías tiroideas, está limitado en investigaciones clínicas y no se extiende como rutina a los diagnósticos histopatológicos, otro motivo para desarrollar la presente investigación y colaborar con la determinación de indicadores morfométricos como área y volumen nuclear que puedan establecer regularidades en este campo.

Al establecer los indicadores morfométricos del núcleo de las células del carcinoma papilar de tiroides, podemos profundizar en el diagnóstico de esta entidad tumoral, aportar una herramienta que no varíe con la subjetividad y contribuir a una mayor precisión en el diagnóstico. Así los pacientes podrán recibir un tratamiento individualizado, teniendo en cuenta las ventajas de un tratamiento quirúrgico conservador y las desventajas de un tratamiento quirúrgico radical.

A partir de los antecedentes referidos y dando continuidad a las líneas de investigación ya mencionadas se define el siguiente **problema científico**:

¿Qué indicadores morfométricos caracterizan al Carcinoma Papilar de Tiroides en pacientes de la provincia Holguín?

OBJETIVO

Analizar el comportamiento de indicadores morfométricos como área nuclear y volumen nuclear en el carcinoma papilar de tiroides.

MÉTODO

Se realizó un estudio de serie de casos con pacientes portadores de carcinoma papilar de tiroides, cuyo objeto estuvo dado por los indicadores morfométricos y el campo de la ciencia la morfometría de las lesiones malignas de la tiroides.

Entre los métodos teóricos se empleó la revisión documental, análisis-síntesis de la información seleccionada y el método histórico-lógico para resumir e interpretar la misma. Del nivel empírico la observación y la morfometría.

Se seleccionó a todos los pacientes atendidos con el diagnóstico histológico de carcinoma papilar de tiroides en el Hospital Provincial **Universitario "Vladimir Ilich Lenin"** en la etapa comprendida desde septiembre del 2015 hasta septiembre del 2017, para un total de 12 pacientes.

Se realizó la recolección de los bloques de parafina con las muestras de tejido tiroideo tumoral y del total de bloques de cada paciente se escogieron dos bloques que cumplieran con los elementos de calidad de inclusión requerida que permitieran su estudio histológico y morfométrico posterior.

A los bloques escogidos de cada paciente se les realizó cinco láminas histológicas con tres cortes consecutivos de 10 micrómetros de espesor y a diferentes niveles de profundidad, con un micrótopo

vertical HistoLine modelo MR 3000 y luego teñidas con Hematoxilina y Eosina (H-E).

De cada lámina se procedió a obtener mediante la digitalización, cinco campos entre los tres cortes para un total de 340 campos, cuyas imágenes se capturaron con una cámara de video digital Moticam de 3 megapíxel acoplada al microscopio trilocular Motic modelo BA-210 con la aplicación digital Motic ImagePlus 3.0 de la compañía China Motic S.A. y conectada a una computadora Dell, modelo Optiplex 7010, de la compañía Dell, mediante cable USB. Los aumentos objetivos empleados fueron de 40x y 100x.

El aumento total (At) de observación de las imágenes capturadas en la computadora se calculó por la fórmula:

$$At = Ao \times ALR \times LP/SC$$

Donde:

At: Aumento total.

Ao: Aumento objetivo.

ALR: Aumento del lente reductor. (0,5)

LP: Largo de pantalla. (340 mm)

SC: Sensor de la cámara digital. (8 mm)

De esta manera el aumento total con el que se trabajaron las imágenes histológicas fue de:

850x con lente objetivo de 40x

2125x con lente objetivo de 100x

Para la realización de las mediciones de los indicadores morfométricos se empleó la aplicación ImageJ, versión 1.49p del National Institutes of Health, USA, 2015.

Se procedió a calibrar para cada aumento objetivo utilizando un portaobjeto de calibración milimetrado múltiple de la Motic.

Los indicadores morfométricos estudiados fueron:

- Área nuclear.
- Volumen nuclear.

Área nuclear:

Se obtuvo con la opción de contorneado del borde externo admisible de los núcleos de las células a manos libres del sistema ImageJ.

Volumen nuclear:

Se obtuvo con la opción Fit Elipse, se contorneó el borde externo admisible de los núcleos de las células a manos libres del sistema ImageJ, el sistema devuelve el diámetro mayor y el diámetro menor de forma automática. Estos valores permiten el cálculo del volumen nuclear de las células epiteliales. Se pasaron los datos de los diámetros mayor y menor a una hoja de cálculo de Microsoft Excel, y se aplicó la fórmula de Palkovits:

$$V = 1,04\pi(A * B)\sqrt{A * B}$$

Donde:

A: Diámetro mayor.

B: Diámetro menor.

π : **3,1416**

Para cumplir el principio esencial de la morfometría, la aleatoriedad de las mediciones, se utiliza la opción Grid del submenú Plugins de la aplicación ImageJ que me permite superponer sobre la imagen digital un conjunto de herramientas, como un cuadriculado, una malla de puntos o cruces o un sistema de líneas paralelas entre otras.

En el estudio se utiliza la malla de cruces, lo que permite medir solo aquellos núcleos sobre los que coinciden las cruces de la malla, como se muestra en la figura 1. Con esta selección aleatoria las mediciones se realizaron a un total de 10 465 núcleos.

El área entre los puntos fue de 50 micrómetros cuadrados.

Procesamiento estadístico.

Se utilizaron hojas de cálculo de Excel para proceder a determinar indicadores que la aplicación ImageJ no nos permite calcularlas.

En todas las series de casos se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con vistas a determinar que los datos obtenidos provienen de una población que cumple los parámetros de la distribución normal.

Se determinaron estadígrafos descriptivos como media, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para una $p \leq 0,05$. Se realizó la regresión lineal entre el volumen nuclear y el factor de forma de los núcleos de las células epiteliales, con su prueba de hipótesis para una $p \leq 0,05$.

El editor estadístico utilizado fue el MyStat versión 12 del 2015 de la compañía SyStat.

La triangulación de los datos obtenidos a partir de la información documental revisada, los datos primarios recopilados y la utilización de métodos adecuados de procesamiento estadístico permitió arribar a conclusiones.

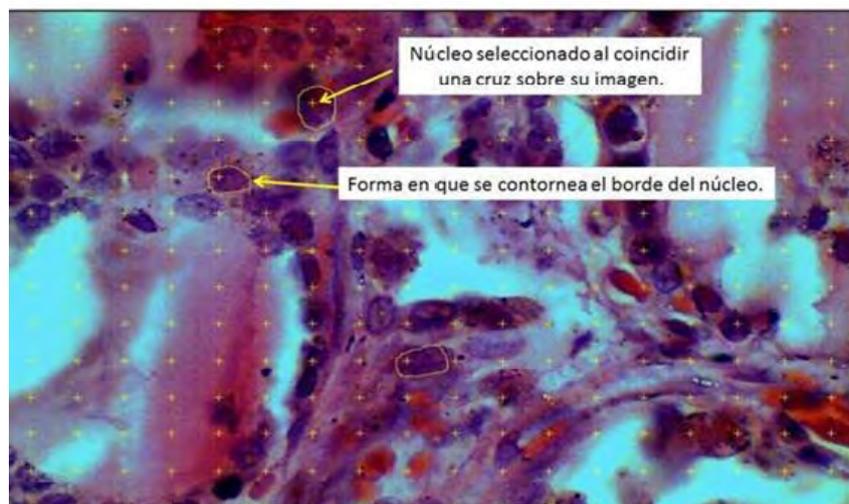


Figura 1. Presentación de una imagen capturada para mostrar la forma en que se procede a realizar las mediciones. Imagen a 2125x de carcinoma papilar de tiroides. Tinción H y E.

Los resultados se muestran en figuras y cuadros.

Aspectos éticos.

Se tuvo en cuenta los Principios Éticos para la Investigación Médica con datos provenientes de seres humanos de la World Medical Association Declaration of Helsinki y la Guía de OMS para los Comité de Ética de las Investigaciones, establecida por el Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) en el 2002.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Resultados cualitativos.

La descripción cualitativa de las láminas histológicas en las enfermedades tumorales tiroideas ha sido bien abordada. Es un método que entrega la máxima certeza al diagnóstico con el que se define el tratamiento y el pronóstico.¹³

Se presta cada vez mayor atención a las características del núcleo celular, componente encargado de mantener la integridad del genoma y controlar todas las actividades celulares.¹⁴

Se ha demostrado por diferentes autores¹⁵⁻¹⁸ que el análisis morfológico del núcleo celular, como variaciones en el número, la forma, tamaño y coloración puede proporcionar información importante sobre la estructura y función de las células y los tejidos.

Histología normal de la tiroides.

La figura 2 corresponde a una imagen histológica vista al microscopio óptico a un aumento de 2125x del tejido tiroideo sano, se observa la típica disposición en folículos tiroideos señalados con llaves, los cuales constituyen la unidad estructural de la glándula, tienen una pared formada por un epitelio simple cúbico, el epitelio folicular, representado por la flecha blanca, y en su interior contienen un material gelatinoso denominado coloide de bordes regulares (flecha amarilla), cuyo componente principal es la tiroglobulina. Las células **foliculares (letra "B") exhiben un citoplasma basófilo pálido y un núcleo esferoidal con un nucléolo prominente.** Las células parafoliculares están situadas en la periferia del epitelio folicular y por dentro de la lámina basal del folículo, estas células no están expuestas a la luz folicular, son pálidas y se distribuyen de manera solitaria o cúmulos pequeños, y son difíciles de detectar en la microscopía óptica.¹³⁻¹⁴

Histología de tiroides con carcinoma papilar.

La figura 3 corresponde a una imagen histológica de tejido tiroideo tumoral. Las flechas señalan el coloide con aspecto homogéneo, denso, descrito como "coloide en goma de mascar".¹⁹ La letra "A" muestra la estratificación que sufre el epitelio folicular^{1,13,20} y los núcleos de las células señalados con la letra "B" se observan aumentados de tamaño con cromatina dispersa que producen un aspecto óptico claro o vacío, que se denomina vidrio esmerilado o núcleos con ojo de la huérfana Annie.^{1,13}

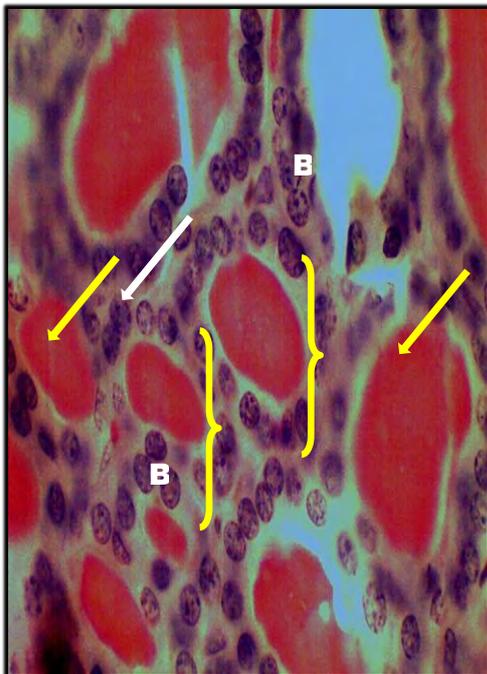


Figura 2. Microfotografía óptica de corte histológico de tiroides. Coloración H-E. Aumento 2125x.

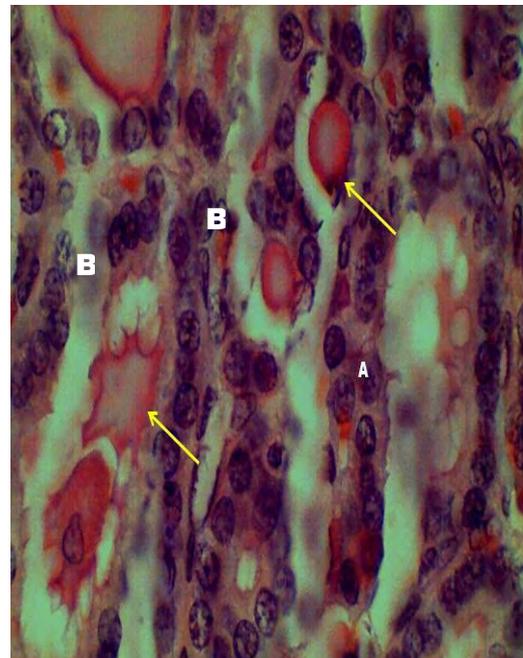


Figura 3. Microfotografía óptica de corte histológico de CPT. Coloración H-E. Aumento 2125x.

Resultados cuantitativos.

El comportamiento de los indicadores morfométricos área y volumen nuclear ha sido descrito por varios autores^{20,7,15-18} y se le confiere valor diagnóstico y pronóstico en muchas enfermedades tumorales. Ambos indicadores son útiles para interpretar el tamaño del núcleo celular y de la célula si se tiene en cuenta lo planteado por Michael D.

et col²¹, pudiéndose observar en su estudio que a mayor núcleo celular mayor tamaño de la célula.

El cuadro 1, caracterización del área y el volumen nuclear del carcinoma papilar de tiroides, muestra los valores mínimo, máximo, la media aritmética y la desviación estándar de los indicadores área y volumen nuclear. Estos indicadores se comportan dentro del intervalo de confianza obtenido en el estudio. El área nuclear con una media de $26,3 \pm 7,51 \mu\text{m}^2$ y el volumen de $634,73 \pm 274,61 \mu\text{m}^3$ muestran un comportamiento semejante a otros trabajos como el de López R.²⁰ en nuestro país y otros como el de Kirillov y Yuschenko¹⁷ en el ámbito internacional, lo que puede ser interpretado como un área y volumen nuclear aumentado si se compara con los valores de área nuclear y volumen nuclear de enfermedades nodulares benignas de los autores rusos Tseleni- Belafouta.¹⁶

Cuadro 1. Caracterización del área y el volumen nuclear en el CPT

Estadísticos	Área nuclear (μm^2)	Volumen nuclear (μm^3)
Campos*	340	340
Mínimo	13,31	217,99
Máximo	49,59	1 614,10
Media Aritmética	26,35	634,73
Desviación Estándar	7,51	274,61
Coeficiente de Variación	0,28	0,43
Límite de confianza mínimo	18,97	605,44
Límite de confianza máximo	19,55	664,03

*Representan 10 465 núcleos medidos

El área nuclear es una unidad bidimensional y el volumen nuclear es una unidad tridimensional cuyo valor se obtiene a partir de una fórmula de la que se puede interpretar que a mayor área mayor volumen nuclear. Tanto el área como el volumen nuclear aumentado

indican que los núcleos celulares son grandes y que su número está disminuido en un campo y por tanto el número de células. Este resultado afirma que en este estudio existe una hipertrofia de los núcleos y no hiperplasia, comportamiento que se corresponde con los tumores bien diferenciados como lo es el CPT, en el que el metabolismo de sus células está encaminado a la síntesis de proteínas estructurales para su diferenciación y en menor medida para el crecimiento del tejido, lo que justifica su crecimiento lento.

La hipertrofia celular es precisamente una respuesta adaptativa que conlleva a un aumento del tamaño de la célula, a expensas de sus componentes celulares y que trae consigo un aumento en el volumen del órgano. Esto ocurre cuando las células tienen una capacidad de división limitada.¹

Los núcleos celulares son hipertróficos teniendo en cuenta su función rectora dentro de la célula, controlando y dirigiendo todos los procesos de síntesis celular y su aumento de volumen a expensas de sus componentes, donde la cromatina laxa necesita mayor espacio que la condensada y los nucléolos prominentes aportan las subunidades ribosomales necesarias para la síntesis, sin negar el papel fundamental de su matriz y la envoltura nuclear.

Este resultado reafirma que la mayoría de las células cancerosas sufren cambios morfológicos, habitualmente por mutaciones en los genes correspondientes, como autosuficiencia en las señales de crecimiento y la insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento.¹ Otros autores como Uma Nahar¹⁸ establecen indicadores morfométricos del núcleo de las células de varias lesiones tumorales de la tiroides y sus resultados y los de este trabajo muestran correspondencia en cuanto a los valores de área y volumen nuclear aumentados, lo que corrobora una vez más que ambos indicadores nucleares pueden tener valor en el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad tumoral tiroidea.

CONCLUSIONES

1. El área y el volumen nuclear en el CPT poseen valores altos comparados con los valores que se observan en enfermedades nodulares benignas lo que puede contribuir a su diagnóstico histopatológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Neoplasias de la glándula tiroides. En: Robbins. Patología Humana [Internet]. 9na ed. España: Elsevier; 2013. [Citado marz 2018]; [Aprox 3p.]. Disponible en: <http://booksmedicos.org/robbins-patologia-humana-9a-edicion/>
2. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud 2017. Dirección de Registros Médicos y Estadísticos de Salud. La Habana; Ciencias Médicas; 2018.
3. Ying C. Henderson, Soon-Hyun Ahn, Junsun Ryu, Yunyun Chen, Michelle D. Development and Characterization of Six New Human. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2015 [citado 23 de marz 2018]; 100(2): [Aprox10p.]. Disponible en: <https://watermark.silverchair.com/jcemE243.pdf>
4. Fuenzalida RR, Vial LI, Rojas OV, Pizarro CF, Puebla RV, Vial LG. Cirugía profiláctica en cáncer medular de tiroides hereditario. Rev Chil Cir. [Internet]. 2017 [citado 26 de marz 2018]; 69(3): [aprox 5 p.]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchcir/v69n3/art17.pdf>.
5. Granada Garcia M. Cáncer de Tiroides Localmente avanzado. Cancerol [internet]. 2009 [citado 8 de abr 2018]; 111(116): [Aprox 5p.]. Disponible en: <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1257542193.pdf>
6. Garavito González G. Cáncer de Tiroides [Internet]. Bogota: Asociación Colombiana de Médica Internista. [citado 8 de abr

- 2018]. Disponible en:
http://www.endocrino.org.co/files/Cancer_de_Tiroides.pdf
7. Shanmuga Priya S, Sandhya Sundaram. Morphology to morphometry in cytological evaluation of thyroid lesions. *J Cytol* [Internet]. 2011 Jul-Sep [citado 26 de marz 2018]; 28(3): [Aprox 5 p.]. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159299/?report=printable>
8. Jung SP, Kim M, Choe JH, Kim JS, Nam SJ, Kim JH. Clinical implication of cancer adhesion in papillary thyroid carcinoma: clinicopathologic characteristics and prognosis analyzed with degree of extrathyroidal extension. *World J Surg* [Internet]. 2013 [citado 18 de abr 2018]; 37(7): [aprox 7 p.]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584460>
9. Hatice T, Ozlem E, Zeliha Esin C, Arsenal Sezgin A. Associations Between Nucleus Size, and Immunohistochemical. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2017 [citado 23 de marz 2018]; [Aprox 8 p.]. Disponible en:
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12253-017-0337-9.pdf>
10. Díaz Rojas PA, Sánchez Meca J. El área nuclear como indicador diagnóstico en el carcinoma ductal de la mama: un estudio metaanalítico. *Rev Cubana Invest. Bioméd* 23(3). Ciudad de la Habana jul.-sep. 2004. Disponible en:
<http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v23n3/ibi04304.pdf>
11. Sanz Pupo Nitza Julia, Ríos Hidalgo Nancy, Seguí Sánchez Mercedes, Díaz Rojas Pedro Augusto, Fernández Pedro Antonio. La digitalización de imágenes aplicadas a la anatomía patológica. Experiencias en la provincia Holguín, Cuba. *Rev Cubana Invest Bioméd* [Internet]. 2006 [Citado 23 de marzo de 2018]; 25(4).
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid= S0864-03002006000400001-&script=sci](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002006000400001-&script=sci)

12. Lopamudra D, Shilpa G, Ruchika G, Kusum G, Kaur CG, Sompal S. Nuclear morphometry and texture analysis on cytological smears. *Malaysian J Pathol* [Internet]. 2017 [citado 23 de marz 2018]; 39(1): [Aprox 5 p.]. Disponible en: <http://www.mjpath.org.my/2017/v39n1/nuclear-morphometry.pdf>
13. Elizondo CA. Histopatología del cáncer de tiroides. *Rev MED Costa Rica y Centroamérica* [Internet]. 2014 [citado 11 mayo de 2015]; LXXI (610): 253 - 258. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/610/art15.pdf>
14. Geneser F. Sistema Endocrino. En: *Histología sobre bases biomoleculares* [internet]. 4ta ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2015 [Citado marz 2018]; [Aprox 31 p.]. Disponible en: <http://booksmedicos.org/geneser-histologia-4a-edicion/>
15. Ferreira RC, Cunha LL, Matos PS, Adam RL, Soares FC, Vassallo J, et al. Chromatin changes in papillary thyroid carcinomas may predict patient outcome. *Cell Oncol* [Internet]. 2013 [citado 18 de abr 2018]; 36 (3): [aprox 7 p.]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13402-012-0116->
16. Tseleni- Belafouta S, Paraskevakou H, Damaris P. Computerized morphometric study on fine needle aspirates of cellular follicular lesions of the thyroid. *Anal Quant Cytol Histol* [Internet]. 2000 Aug. [citado 11 mayo 2018]; 22(4): [aprox. 4 p.]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10965408>
17. Kirillov VA, Yuschenko YP, Pappleuka AA, Demidchik EP. Thyroid carcinoma diagnosis based on a karyometric parameters of follicular cells. *Cancer* [Internet]. 2001 Oct. 1 [citado 10 mayo 2018]; 92(7): [aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745254>.
18. Uma Najar. Image Cytometry of Insular Carcinoma. *Diagnostic Cytopathol* [Internet]. 2011 [citado 26 de marz 2018]; 40(2):

[Aprox 3 p.]. Disponible en: <http://content.ebscohost.com/ContentServer.asp?T=P&P=AN&K=22246939&S=R&D=mdc&EbscoContent=dGJyMNLr40Sep7A4y9f3OLCmr02ep65SsKi4S7eWxWXS&ContentCustomer=dGJyMPGnr06vr7JJuePfgeyx44Dt6fIA>

19. Monappa V, Kudva R. Cytomorphologic Diversity of Papillary Thyroid Carcinoma. Disponible en: J Cytol [Internet]. 2017 Oct-Dec [citado 23 de marz 2018]; 34(4): [Aprox 5 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118471>
20. López Pérez R, García Gutiérrez M, Pérez Pérez de Prado N, López Pérez G. Estudio histomorfométrico del núcleo celular del carcinoma papilar de Tiroides. Medicent Electrón [Internet]. 2013 [citado 18 de abr 2018]; 17(1): [aprox 8 p.]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mdc/v17n1/mdc03113.pdf>
21. Michael D, Larry G. The size-wise nucleus: nuclear volume control in eukaryotes. J Cell Biol [Internet]. 2007 [citado 20 de abr 2018]; 179(4) : [Aprox 1 p.]. Disponible en: 10.1083/jcb.200710156