

Utilidad de la PCR en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas

Usefulness of PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples

Sebastian Iglesias Osoreo^{1*}



Charles Ruiz Torres²



Giancarlo Becerra Atoche³



¹Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.

²Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Señor de Sipán. Chiclayo, Perú.

³Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Cesar Vallejo. Piura, Perú.

*Autor para correspondencia. Correo electrónico: sebasiglo@gmail.com, siglesias@unprg.edu.pe

Recibido: 22/02/2022.

Aprobado: 31/03/2022.

RESUMEN

Introducción: La tuberculosis es una enfermedad infecciosa altamente prevalente en todo el mundo.

Objetivo: Determinar la utilidad diagnóstica de *M. tuberculosis* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes de un hospital del norte de Perú.

Métodos: Las muestras clínicas de los pacientes se procesaron para la extracción de ADN por el método salting out. Para determinar si el patógeno la muestra de esputo pertenece al complejo *M. tuberculosis* se emplearon los marcadores que amplifican IS6110, se amplificó usando la técnica PCR y luego los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio al 1%. El estudio se realizó en el Hospital Regional Lambayeque, Chiclayo, Lambayeque, Perú.

Resultados: Se evaluaron 148 muestras de pacientes: 72 (48%) varones y 77 (52%) mujeres. Las edades fluctuaron desde los cinco a los noventa y tres años, con una media de 45,85 años. Se observó que 105

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis is a highly prevalent infectious disease worldwide.

Objective: To determine the diagnostic usefulness of *M. tuberculosis* by polymerase chain reaction technique (PCR) in patients from a hospital at northern Peru.

Methods: Clinical samples from patients were processed for DNA extraction by the salting out method. To determine if the pathogen in the sputum sample belongs to the *M. tuberculosis* complex, markers that amplify IS6110 were used, amplified using the PCR technique and then the PCR products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized by staining with 1% ethidium bromide. The study was conducted at the Hospital Regional Lambayeque, Chiclayo, Lambayeque, Peru.

Results: A total of 148 patient samples were evaluated: 72 (48%) males and 77 (52%) females. Ages ranged from five to ninety-three years old, with an average age of 45.85 years old. It was observed that 105 (70%) patients tested negative for tuberculosis and 44 (30%) tested positive for tuberculosis. In addition, 24 (55%) positive male patients

(70%) pacientes resultaron negativos para la prueba de tuberculosis y 44 (30%) positivo. Se detectaron además 24 (55%) pacientes varones que fueron positivos y 20 (45%) pacientes mujeres que fueron negativas. En las muestras que resultaron positivo para TBC se encontraron: 2 (5%) biopsia de absceso, 2 (5%) biopsia de intestino, 17 (39%) lavado bronqueo alveolar, 4 (9%) líquido cefalorraquídeo, 17 (39%) líquido pleural y 2 (5%) líquido peritoneal.

Conclusiones: Se puede detectar *Mycobacterium tuberculosis* en muestras pulmonares y extra pulmonares en pacientes hospitalarios.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis pulmonar, reacción en cadena de la polimerasa, PCR

were detected as well as 20 (45%) negative female patients. In the samples that tested positive for TB, two abscess biopsy (5%), two intestinal biopsy (5%), seventeen bronchoalveolar lavage (39%), four cerebrospinal fluid (9%), seventeen pleural fluid (39%) and two peritoneal fluid (5%) were found.

Conclusions: *Mycobacterium tuberculosis* can be detected in pulmonary and extrapulmonary samples in hospital patients.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, pulmonary, polymerase chain reaction, PCR

Introducción

La tuberculosis (TB) sigue siendo una de las principales enfermedades infecciosas en todo el mundo y sobre todo en países en desarrollo, causada por *Mycobacterium tuberculosis*.⁽¹⁾ En 2018, alrededor de 1,5 millones de personas en todo el mundo murieron de tuberculosis y se estima que 1700 millones de personas en todo el mundo están infectadas durante el periodo de incubación sin ningún síntoma evidente.⁽²⁾

La TB daña principalmente los pulmones, causando la tuberculosis pulmonar, pero también puede dañar otros órganos, causando tuberculosis ósea, tuberculosis nerviosa, tuberculosis cutánea, tuberculosis renal y otras infecciones.^(2,3)

El diagnóstico de TBEP es difícil debido a la naturaleza paucibacilar de las muestras, la falta de volúmenes de muestras clínicas adecuadas, la distribución no uniforme de bacterias en esas muestras y la localización de la enfermedad en sitios de difícil acceso que con frecuencia se asemeja a otras enfermedades.^(4,5,6) La TBEP representa del 5–20% de todos los casos de TB.⁽⁵⁾

El uso generalizado de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de ADN (RFLP) para diferenciar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* para detectar tuberculosis se ha visto obstaculizado por la necesidad de cultivar este organismo de crecimiento lento y por el nivel de sofisticación técnica necesaria para la tipificación de RFLP.⁽⁷⁾ El problema central en la demora del diagnóstico y el tratamiento es común por falta de diagnóstico específico.⁽⁸⁾

En la década de 1980, después de una disminución constante durante las décadas anteriores, hubo un resurgimiento en la tasa de tuberculosis en los Estados Unidos que coincidió con la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.⁽⁹⁾

Los patrones de enfermedad desde entonces han cambiado, con una mayor incidencia de enfermedad diseminada y extrapulmonar ahora encontrada. Los sitios de infección extrapulmonar comúnmente incluyen ganglios linfáticos, pleura y áreas osteoarticulares, aunque cualquier órgano puede estar involucrado.^(5,10)

El diagnóstico de TBEP puede ser difícil de alcanzar, lo que requiere un alto índice de sospecha en los pacientes. El diagnóstico definitivo y rápido es un desafío, ya que las técnicas convencionales tienen limitaciones.⁽⁴⁾ Por tanto, la presente investigación busca determinar los casos de *M. tuberculosis* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes de un hospital del norte de Perú.

Método

Población y muestra de estudio

Estudio retrospectivo de corte transversal, se evaluaron muestras de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar y no pulmonar del año 2015 al 2019 de los servicios de oncología, neumología, ginecología, dermatología, gastroenterología, neurología y pediatría, las muestras fueron diversas (líquido cefalorraquídeo o LCR, líquido pleura, biopsias, líquido ascítico), los pacientes fueron derivados para estudios complementarios de distintos servicios médicos, el estudio contó con la aprobación del comité de ética del Hospital Regional Lambayeque, Chiclayo, Lambayeque, Perú.

Identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR

Las muestras clínicas de los pacientes serán procesadas para la extracción de ADN por el método *salting out*. Para determinar si el patógeno de la muestra de esputo pertenece al complejo *M. tuberculosis* se emplearon los marcadores que amplifican IS6110, las amplificaciones se realizarán bajo las siguientes condiciones 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de mezcla de dNTPs; 1,2 uM de cada primer y 1U de enzima Taq ADN polimerasa. Las condiciones en el termociclador serán las siguientes: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C durante 1 min, 64 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, con una extensión final de 72 °C por 7 min.

Luego los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio al 1%. Se empleó el fotodocumentador Pharos Fx para digitalizar la imagen en conjunto con el software Quantity One para determinar el peso molecular de los productos de amplificación. El marcador IS6110 F 5' CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG y IS6110 R 5'CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG el que permite la amplificación de 123 bp⁽¹¹⁾ bajo las condiciones, temperatura de denaturación 94°C, 68°C, and 72°C 1 min cada número de ciclos. Además se hizo una amplificación con un fragmento de 268 pb del gen de la beta-globina humana para demostrar la presencia de ADN idóneo.⁽¹²⁾

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Para la recolección de la información se elaboró una base de datos en Microsoft Excel. Las variables cualitativas se describirán con frecuencias absolutas y relativas, con el paquete estadístico Infostat 2018. Se aceptó como significativa toda p menor de 0,05.

Resultados

Se evaluaron las muestras de 72 (48%) pacientes varones y 77 (52%) pacientes mujeres. Las edades van desde los cinco años a los noventa y tres con una media de 45,85 años (DE 8,7). Se observó que 105 (70%) pacientes fueron negativos y 44 (30%) positivos para la prueba de tuberculosis. Detectamos además 24 (55%) pacientes varones que fueron positivos y 20 (45%) mujeres que fueron negativos.

Tabla I. Tipo de muestras que se usaron para la detección molecular de tuberculosis

Tipo de Muestra	n	%
Biopsia absceso	3	2,01
Biopsia de colon	1	0,67
Biopsia de mama	6	4,03
Biopsia intestino	3	2,01
Biopsia piel	1	0,67
Biopsia recto	3	2,01
Jugo gástrico	2	1,34
Lavado bronqueo alveolar	67	44,97
Líquido cefalorraquídeo	14	9,40
Líquido pericárdico	1	0,67
Líquido pleural	43	28,86
Líquido osteoarticular	2	1,34
Líquido peritoneal	3	2,01

Discusión

En la actualidad, el diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar se basa en la microscopía. Sin embargo, esta técnica es insensible y muchos casos no pueden confirmarse inicialmente.⁽¹³⁾ Las técnicas de amplificación de ácido nucleico son extremadamente sensibles, pero cuando se aplican al diagnóstico de tuberculosis, han dado resultados variables. Con tuberculosis con muestras con cultivo negativo y con baciloscopia positiva se puede diagnosticar en el momento del ingreso, y potencialmente todos los pacientes con muestras con baciloscopia positiva se pueden confirmar inmediatamente como infectados con *M. tuberculosis*, que conduce a una mejor gestión clínica.⁽¹⁴⁾

Los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* contienen el elemento transponible IS6110 que, debido a su alto polimorfismo numérico y posicional, se ha convertido en un marcador ampliamente utilizado en estudios epidemiológicos.⁽¹⁵⁾

La especificidad de IS6110 para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*.⁽¹⁶⁾ En nuestro estudio se ha detectado el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de biopsia de absceso que pueden detectarse en abscesos fríos tuberculosos o gomas son inusuales y producto de la diseminación hematogena de micobacterias.⁽¹⁷⁾ Esta forma de tuberculosis es muy inusual.

En este estudio se detectó *Mycobacterium tuberculosis* en biopsia de intestino que puede estar relacionada con una tuberculosis rectal que simula un cáncer de recto,⁽¹⁸⁾ las muestras de lavado bronqueo alveolar son muestras donde se puede detectar con facilidad a *Mycobacterium tuberculosis*.⁽¹⁹⁾

En este trabajo se usó un método de PCR para el diagnóstico rápido y preciso de meningitis tuberculosa (TBM) en muestras de LCR.⁽²⁰⁾

Los fluidos en los que rara vez se encuentra *Mycobacterium tuberculosis*, como los líquidos pleurales y cerebrospinales, son buenos candidatos para ser estudiados utilizando técnicas de PCR.

La alta especificidad del fragmento MPB64 a la vez que conserva una buena sensibilidad lo hace muy adecuado para el diagnóstico de tuberculosis pleural y cerebroespinal.⁽²¹⁾

El diagnóstico de la tuberculosis pleural usualmente presenta la dificultad característica de demostrar la infección por *Mycobacterium tuberculosis* mediante confirmación directa en

tinciones y cultivos, lo que ha impulsado el establecimiento de nuevos criterios y el desarrollo de intervenciones dirigidas a mejorar la sensibilidad de los métodos diagnósticos. Se reporta el caso de un paciente con derrame pleural unilateral cuya presentación clínica satisface los criterios diagnósticos de tal condición⁽²²⁾ y en el caso del líquido peritoneal siendo esta una forma de tuberculosis donde se observa la presencia de granulomas necrotizantes de *Mycobacterium tuberculosis* en líquido ascítico.⁽²³⁾

Otros estudios muestran los bajos rendimientos por frotis y cultivo se atribuyen a la carga paucibacilar en los especímenes. La mayor sensibilidad en la PCR se logró con IS6110; los valores de sensibilidad y especificidad fueron 83 y 93,8%, 87,5% y 100%, y 66,7% y 75%, respectivamente, en muestras de líquido pleural, tejido pleural biopsiado con aguja y ganglios linfáticos.⁽⁴⁾

Es importante señalar que la validez de los resultados de la PCR en estudios clínicos depende del uso de controles de contaminación paralelos a todos los pasos de la PCR y la simplicidad del método de extracción de ADN, así como de la especificidad de los resultados de la PCR.⁽²⁴⁾ Las técnicas de diagnóstico basadas en PCR tienen dos problemas principales: reacciones falsas positivas debido a la contaminación con fragmentos de ADN de PCR anteriores (amplicones) y reacciones falsas negativas causadas por inhibidores que interfieren con la PCR.⁽²⁵⁾

Una de las limitaciones del estudio es contar con un pequeño tamaño de muestra, se contó además con un resultado desconocido por baciloscopia al momento de realizar el estudio, se recomienda hacer una comparativa de PCR y cultivo bacteriano. Los resultados obtenidos por PCR fueron consistentes con los obtenidos con cultivo, que es el "estándar de oro" demostrando que la PCR es una técnica útil para el diagnóstico rápido de tuberculosis en varios sitios.⁽²⁵⁾

Conclusiones

Se puede detectar *Mycobacterium tuberculosis* en muestras pulmonares y extrapulmonares de pacientes hospitalizados.

Referencias Bibliográficas

1. Emery JC, Richards AS, Dale KD, McQuaid CF, White RG, Denholm JT, Houben RMGJ. Self-clearance of *Mycobacterium tuberculosis* infection: implications for lifetime risk and population at-risk of tuberculosis disease. *Proc Biol Sci*. 2020[citado 20/01/2022]; 288(1943): 20201635. Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1635>
2. Cao XJ, Li YP, Wang JY, Zhou J, Guo XG. MPT64 assays for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Infect Dis*. 2021[citado 20/01/2022]; 21: 336. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06022-w>
3. Hayward SE, Rustage K, Nellums LB, van der Werf MJ, Noori T, Boccia D, et al. Extrapulmonary tuberculosis among migrants in Europe, 1995 to 2017. *Clin Microbiol Infect*. 2021[citado 20/01/2022]; 27(9): 1347.e1–1347.e7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8437049/?report=reader>
4. Mechal Y, Benaissa E, Benlahlou Y, Bssaibis F, Zegmout A, Chadli M, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF system performances in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *BMC infectious Diseases*. 2019[citado 20/01/2022]; 19(1069): 1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4687-7>
5. Baykan AH, Sayiner HS, Aydin E, Koc M, Inan I, Erturk SM. Extrapulmonary tuberculosis: an old but resurgent problem. *Insights Imaging*. 2022[citado 20/01/2022]; 13(1): 39. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13244-022-01172-0>
6. Diriba G, Kebede A, Tola HH, Alemu A, Yew B, Moga S, et al. Mycobacterial Lineages Associated with Drug Resistance in Patients with Extrapulmonary Tuberculosis in Addis Ababa, Ethiopia. *Tuberc Res Treat*. 2021[citado 20/01/2022]; 2021: 5239529. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8476284/pdf/TRT2021-5239529.pdf>

7. Sarro YD, Kone B, Diarra B, Kumar A, Kodio O, Fofana DB, *et al.* Simultaneous diagnosis of tuberculous and non-tuberculous mycobacterial diseases: Time for a better patient management. *Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 [citado 20/01/2022];3(3):1-4. Disponible en:

<https://www.oatext.com/pdf/CMID-3-144.pdf>

8. Galvin J, Tiberi S, Akkerman O, Kerstjens HAM, Kunst H, Kurhasani X, *et al.* Pulmonary tuberculosis in intensive care setting, with a focus on the use of severity scores, a multinational collaborative systematic review. *Pulmonology.* 2022[citado 20/01/2022]; 28 (4): 297-309.

Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2022.01.016>

9. Wang DM, Li QF, Zhu M, Xu YH, Liao Y. Clinical characteristics, common sites and drug resistance profile in culture-confirmed extrapulmonary TB/HIVco-infection patients, Southwest China. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022[citado 20/01/2022]; 28:1-7. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521002721?via%3Dihub>

10. Marín-Huergo ME, López-Garza NS, Dávalos-Fuentes MS. Manifestaciones de tuberculosis en cabeza y cuello. *An Orl Mex.* 2021[citado 20/01/2022];66(4):321-329. Disponible en:

<https://doi.org/10.24245/aorl.v66i4.7086>

11. Kamariza M, Shieh P, Ealand CS, Peters JS, Chu B, Rodríguez-Rivera P, *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum with a solvatochromic trehalose probe. *Sci Transl Med.* 2018[20/01/2022];10(430). Disponible en:

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam6310>

12. Totsch M, Schmid KW, Brommelkamp E, St Ü Cker A, Puelacher C, Sidoroff G, *et al.* Rapid detection of mycobacterial dna in clinical samples by multiplex pcr. *Diagn Mol Pathol.* 1994;3(4):260-264

13. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, *et al.* Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006 [citado 20/01/2022];6(9):570-581. Disponible en:

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70578-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70578-3)

14. Bennedsen J, Thomsen VO, Pfyffer GE, Funke G, Feldmann K, Beneke A, *et al.* Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.*1996 [citado 20/01/2022];34(6):1407-1411. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229033/>

15. McEvoy CR, Falmer AA, Gey van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2007 [citado 20/01/2022];87(5):393-404. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472979207000649>

16. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1996 [citado 20/01/2022];34(11):2843-2846. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229418/>

17. Marco A, Solé R, Ragner E, Aranda M. Goma o absceso tuberculoso metastásico como diagnóstico inicial de tuberculosis en un paciente inmunocompetente: una presentación inusual. *Rev Española Sanid Penit.*2014 [citado 20/01/2022];16(2):59-62. Disponible en:

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1575-06202014000200005

18. Gompertz M, Carreño L, Gil La Rotta LC. Tuberculosis rectal: presentación clínica infrecuente y diagnóstico diferencial con enfermedad de Crohn. *Rev Gastroenterol Mex.*2019[citado 20/01/2022]; 84 (4): 524-526. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0375090619300655?via%3Dihub>

19. Kibiki GS, Mulder B, Van Der Ven AJAM, Sam N, Boeree MJ, Van Der Zanden A, *et al.* Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M. tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid. *Trop Med Int Heal.*2007 [citado 20/01/2022];12(10):1210-1217. Disponible en:

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3156.2007.01907.x>

20.Hammami F, Koubaa M, Chakroun A, Rekik K, Feki W, Marrakchi C. et al. Comparative analysis between tuberculous meningitis and other forms of extrapulmonary tuberculosis. *Germes*. 2021[citado 20/01/2022]; 11(1): 23–31. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8057847/>

21.Martins LC, Paschoal IA, Von Nowakonski A, Silva SA, Costa FF, Ward LS, et al. Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000[citado 20/01/2022];33(3):253-257. Disponible en:

http://old.scielo.br/scielo.php?pid=S003786822000000300003&script=sci_abstract&tlng=en

22. Miyamoto J, Koga H, Kohno S, Matsuda H, Yoshitomi Y, Miyazaki Y, Kaku M, Miyazaki T, Watanabe K, Oe T, et al. [A clinical study of tuberculous pleurisy]. *Kekkaku*. 1992;67(7):509-513.

23.Lado Lado FL, Cabana González B, Ferreiro Regueiro MJ, Cabarcos Ortiz de Barrón A, Donado Budiño E. Peritonitis tuberculosa: Aportación de tres casos. *An Med Interna*. 2002 [citado 20/01/2022];19(6). Disponible en:

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992002000600005

24.Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fischer M, Mauch H, et al. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J Clin Microbiol*.1995 [citado 20/01/2022];33(1):90-95. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jcm.33.1.90-95.1995>

25.Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, Van Leeuwen J, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1994[citado 20/01/2022];32(3):672-678. Disponible en:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.32.3.672-678.1994>

Financiamiento

Autofinanciado.

Conflicto de intereses

Los autores no refieren conflicto de intereses.

Contribución de autoría

Conceptualización: Sebastian Iglesias-Osores

Curación de datos: Sebastian Iglesias-Osores, Charles Ruiz-Torres, Giancarlo Becerra-Atoche

Análisis formal: Sebastian Iglesias-Osores

Redacción – borrador original: Sebastian Iglesias-Osores

Redacción – revisión y edición: Sebastian Iglesias-Osores, Charles Ruiz-Torres, Giancarlo Becerra-Atoche



Esta obra está bajo [una licencia de Creative Commons Reconocimiento-](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[No Comercial 4.0 Internacional.](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)