
Determinación de las mutaciones más frecuentes en pacientes con fibrosis quística, Ecuador. Análisis de mutaciones en el gen CFTR por técnica de hibridación reversa in situ y heterodúplex: junio 1996–enero 2004

The most frequent mutation in patients with Cystic Fybrosis in Ecuador. Using the techniques of reverse in situ hybridization and heteroduplex to analyze mutations of the CFTR gene: june 1996 – january 2004.

SEGUNDA MEJOR TESIS DOCTORAL XXXIV PROMOCIÓN DE DOCTORES EN MEDICINA Y CIRUGÍA 2005-2006 FACULTAD CIENCIAS MÉDICAS UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

Édison Patricio Valle Giler *

Resumen

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria más común y letal que existe; es de carácter autosómico recesivo, de afección multisistémica, causada por una mutación en el gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) ubicado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31.2).

Tipo de estudio: descriptivo.

Justificativo: Ecuador es uno de los pocos países latinoamericanos en los que aún no se conoce la verdadera incidencia y frecuencia de las mutaciones que afectan a los pacientes que padecen de fibrosis quística.

Objetivos: Establecer el primer registro molecular de las mutaciones más frecuentes de la población de FQ ecuatoriana. Establecer la incidencia estimada de la enfermedad en el Ecuador.

Resultados: Se incluyeron 62 pacientes en el estudio desde 1996 al 2004. Se determinó una incidencia estimada de 1:11.252 nacidos vivos durante el año 2004, con un estimado de 25 nacidos vivos afectados de fibrosis quística durante el referido año. La frecuencia de las mutaciones halladas fue $\Delta F508$ 37.1%, G85E 8.9%, G542X 2.4%, N1303K 2.4%, G551D 1.6% y R334W 0.8%. La frecuencia de la mutación G85E (8,9%) encontrada en Ecuador es la más alta a nivel mundial, incluso mayor a la del sur de Grecia de donde se cree que es originaria dicha mutación.

Conclusiones y recomendaciones: La sensibilidad de los métodos utilizados (heterodúplex e hibridación reversa in situ) en relación a la población ecuatoriana fue 53,22%, que representa el porcentaje de mutaciones que se pudieron encontrar. Aunque aceptable en relación a los resultados encontrados a nivel mundial, este porcentaje plantea la imprescindible necesidad de utilizar secuenciación para establecer ese gran porcentaje de mutaciones que permanecen como no conocidas (WT).

Palabras clave: Mutaciones. Fibrosis quística. Hibridación reversa. Proteína CFTR. Test de sudor.

Summary

Cystic Fybrosis is a autosomal recessive disease that is very common. It affects multi-organs and caused by the mutation of CFTR gene (cystic fibrosis transmembrane regulator) which is found on the long arm of chromosome 7.

Type of study: descriptive

Justification: Ecuador is one of the countries in Latin America that we still don't know the incidence and frequency of the mutations that affect patients with Cystic Fybrosis.

Objectives:

- To establish which are the most common mutations in patients with Cystic Fybrosis in Ecuador.
- To establish the incidence of this disease in Ecuador.

Results: In this study 62 patients were found during 1996 to 2004. An incidence of 1:11252 born alive a total of 25 newborns had cystic fybrosis during this year. The frequencies for the mutations found were: $\Delta F508$:37.1%, G85E: 8.9%, G542X: 2.4%, N1303: 2.4%, G551D: 1.6%, R334W: 0.8%. The frequency of gene mutation G85E has been found to be the highest in Ecuador other to other countries including South of Greece where the mutation originated.

Conclusion and Recommendations: The sensitivity of the techniques used was 53.22% which represents the percentage of mutations that were found. Even though this is acceptable in relation to the results found worldwide, this percentage shows us how important it is to use mutation screening to establish the percentage of mutations that are unknown.

Key words: Mutations. Cystic Fybrosis. Reverse Hybridization. CFTR protein. Sweat Test.

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es una alteración autosómica recesiva, causada por una mutación en el gen de la FQ ubicado en el brazo largo del cromosoma 7, que tiene como consecuencia la producción anormal de una proteína de 1480 aminoácidos llamada CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) que funciona como un canal transmembrana regulando a su vez a los canales de sodio y cloro a su alrededor²¹.

El resultado de dicha mutación es el aumento generalizado en la consistencia de las secreciones glandulares, lo que se traduce en problemas como infecciones pulmonares a repetición y bronquiectasias, insuficiencia pancreática, hepatitis y esterilidad; que comprometen seriamente la calidad de vida y modifican el normal desarrollo del individuo afecto de esta patología¹⁰.

El diagnóstico de FQ se basa en un test de sudor cuantitativo con cloro mayor o igual a 60 mEq/l más una o varias de las siguientes características^{2, 22, 6}.

- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- Insuficiencia pancreática exócrina documentada
- Historia familiar positiva
- Presencia de dos mutaciones en el gen de la fibrosis quística

La identificación molecular permite categorizar el tipo de mutación que tiene el paciente, y según aquello, pensar en mejor o peor pronóstico del paciente en cuanto a suficiencia pancreática y por ende a sobrevivencia^{1,7}. Además, el investigar la mutación que tiene el posible paciente facilita el diagnóstico en aquellos individuos que posean resultados negativos en el test de sudor¹⁴.

Ecuador es uno de los países latinoamericanos en donde muy pocos son los trabajos realizados sobre fibrosis quística¹⁸, de manera que ni siquiera se conoce la frecuencia real de las mutaciones más comunes presentes en su población de afectados³.

El presente trabajo apuntó a establecer el primer registro molecular de las mutaciones más frecuentes de la población ecuatoriana que padece de FQ.

Los objetivos fueron identificar las mutaciones más frecuentes que afectan a los niños que padecen

FQ, en el Ecuador, analizando a una población significativa de afectados; y, establecer la incidencia estimada de la enfermedad en el Ecuador.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo cuyo universo fueron todos los pacientes agrupados en las Fundaciones Fibrosis Quística de Quito y Guayaquil, que son las instituciones que agrupan a casi todos los individuos afectados de dicha patología en el Ecuador. Se tomó como muestra a los pacientes de dichas entidades que asistieron a la convocatoria y, que voluntariamente previo consentimiento informado, aceptaron ser parte del estudio durante el período 1996-2004. Se incluyeron a los pacientes que tenían manifestaciones clínicas de FQ y que además tenían realizado un test de sudor positivo y se excluyó a aquellos que no tenían realizada dicha prueba.

Se extrajo ADN de sangre venosa periférica utilizando el método modificado de *salting out*¹⁶ y previa cuantificación de su concentración a 3ng/ul; se guardó el material genético obtenido (ADN) a menos 20°C.

Posteriormente, y previa amplificación enzimática o PCR (Polimerase Chain Reaction) de los ADNs, se estudió el gen CFTR por medio de la técnica de heterodúplex para identificar la mutación $\Delta F508$.

En los pacientes homocigotos para esta mutación se dió por concluido el estudio, mientras que los pacientes que no tuvieron en su genotipo uno o ambos alelos con esta mutación ($\Delta F508$) pasaron a la siguiente fase del estudio.

En esta etapa se analizaron los ADNs por medio de una técnica de hibridación reversa in situ (test INNO-LiPA CFTR 29+Tn) que identifica las 29 mutaciones europeas más frecuentes del gen de la FQ [25] (E60X; G85E; 394delTT; 621+1G→T; R117H; 711+5G→A; 1078delT; R347P; R334W; A455E; Tn; $\Delta F508$; $\Delta I507$; G542X; 1717-1G→A; G551D; R553X; R560T; Q552X; 2183AA→G; 2184delA; 2143delT; 2789+5G→A; R1162X; 3659delC; 3849+10kb→T; 3905insT; W1282X; S1251N y N1303K) además del alelo 5T, relacionado con la ausencia bilateral de vasos deferentes²⁵. Con esta última técnica, se

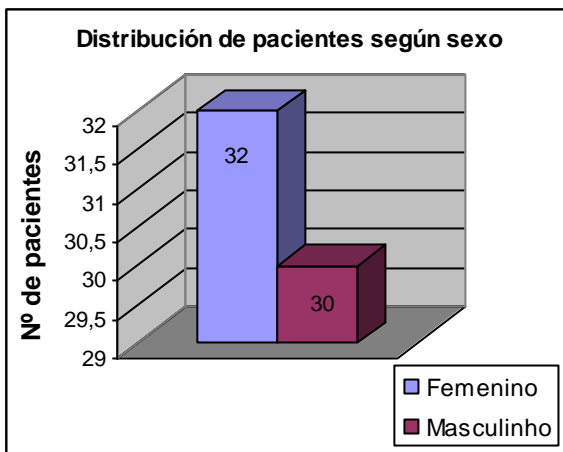
corroboraron los resultados del estudio de $\Delta F508$ con heterodúplex y se identificaron otras mutaciones que presentaban los pacientes. Posteriormente, se ingresó toda la información recabada en el programa Excel y se analizó la frecuencia y los porcentajes en que se presentó cada mutación, además, se analizaron las principales características de dichos pacientes (edad, sexo, procedencia, test de sudor, etc.).

Finalmente, se entregaron los resultados de todas las pruebas genéticas a las Fundaciones Fibrosis Quística de Guayaquil y Quito para que ellos a su vez los entreguen a los pacientes.

Resultados y discusión

Desde enero de 1996 a enero del 2004 se incluyeron 62 pacientes no relacionados familiarmente y sin diferencias estadísticas en la distribución por sexo (figura 1). Hasta el momento no hemos encontrado ningún estudio referente a fibrosis quística en el Ecuador que incluya un número de pacientes superior a este estudio.

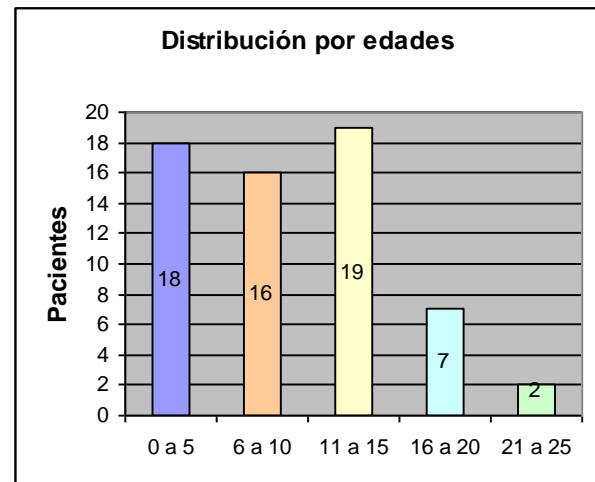
Figura 1



Fuente: Autor

La distribución por edades nos mostró un descenso brusco del número de pacientes mayores de 15 años (figura 2), reflejando quizás la poca sobrevivencia que este grupo de pacientes logra en países subdesarrollados como el nuestro. Es decir que si bien se reportan sobrevivencias promedio de 32 años en países desarrollados⁵, eso no se aplicaría en nuestro país, en donde menos de un cuarto de los pacientes sobrepasaría esta edad.

Figura 2

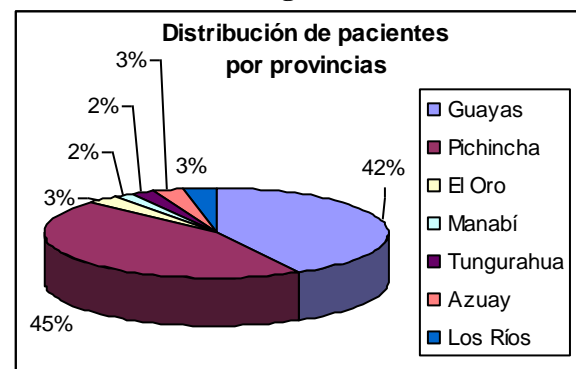


Fuente: Autor

La mayoría de los pacientes provinieron de Pichincha y Guayas (figura 3), probablemente debido a que en esas provincias es donde funciona la Fundación Fibrosis Quística como entidad benéfica que presta ayuda económica y psicológica invaluable a los pacientes con FQ.

Otra posible explicación de este fenómeno es que ambas provincias son los lugares que cuentan con centros médicos de importante nivel para el diagnóstico y atención de este tipo de pacientes.

Figura 3



Fuente: Autor

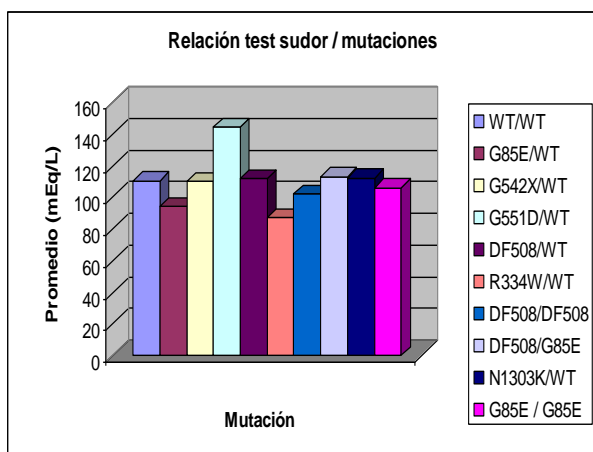
Para calcular la incidencia de la enfermedad en el Ecuador tomamos al año 2001 por ser el período del último censo poblacional en el país; y, al cantón Guayaquil por ser el sitio que registra la mayor cantidad de migración desde otras provincias del Ecuador¹².

De esta manera, los nacidos vivos durante dicho año fueron 45.011¹² y los nacidos con FQ en dicho período fueron 4, hallándose una incidencia de 1:11.252 nacidos vivos. Al proyectar estos datos al número de nacidos vivos en todo el país durante dicho año (278.170) se obtuvo un total de 25, que debería ser el número estimado de nacidos vivos afectados de FQ durante ese periodo.

Esta incidencia estimada de fibrosis quística es menor a la reportada en otros países de habla hispana, 1:9,000 en México¹⁷, 1:9,600 en Uruguay¹⁵, 1:6,573 en Argentina^{4, 24}, siendo atribuible a que en nuestro país, a diferencia del gran porcentaje de blancos que existen en los países antes citados, tres cuartas partes de la población es mestiza, con un porcentaje mínimo de blancos, indígenas, mulatos y negros¹².

Al relacionar los niveles de cloro encontrados en el test de sudor con el tipo de mutación hallada, todas las combinaciones de mutaciones proyectaron niveles promedio de cloro superiores a 60mEq/L (figura 4), efecto probablemente debido a que ninguna de las mutaciones reportadas en este estudio pertenece al grupo que se relaciona con niveles bajos de cloro en el test de sudor¹⁴.

Figura 4



Fuente: Autor

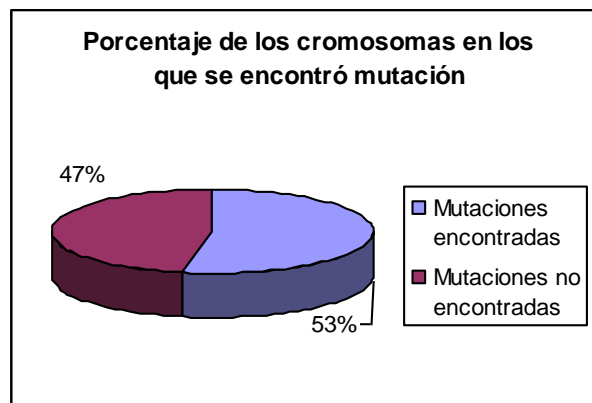
Con respecto al análisis de los genotipos, se estudiaron 124 cromosomas, se encontraron las mutaciones en el 53.22% de todos los haplotipos (figura 5) y se resolvieron completamente los genotipos en 17 pacientes. WT fue el alelo más

frecuente (46.8%) (Tabla 1) y estuvo presente en casi todas las combinaciones de genotipos encontradas (figura 6).

Este gran porcentaje agrupa a las mutaciones no identificadas por los métodos empleados y nos indica que dichas mutaciones pueden estar distribuidas alrededor de cualquiera de los exones e intrones que forman la secuencia completa de ADN del gen de la fibrosis quística.

Este fenómeno nos plantea el hecho que seguramente existe un gran número de mutaciones diferentes a las identificadas por INNO-LiPA, pudiendo incluso no estar descritas aún en la literatura y siendo estas últimas específicas de la población ecuatoriana.

Figura 5



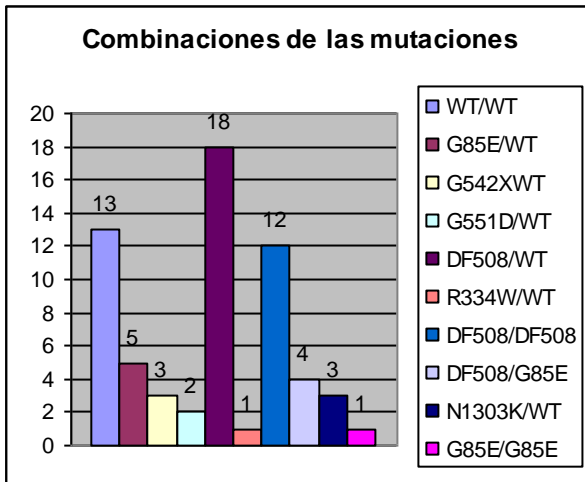
Fuente: Autor

Tabla 1

Mutación	Frecuencia Alélica	Porcentaje
ΔF508	46	37.1
WT	58	46.8
G85E	11	8.9
G542X	3	2.4
G551D	2	1.6
R334W	1	0.8
N1303K	3	2.4
Total	124	100%

Fuente: Autor

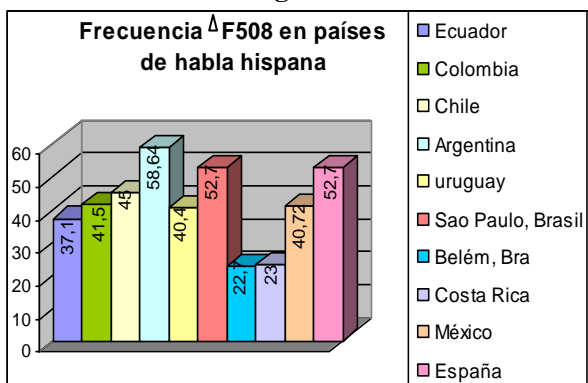
Figura 6



Fuente: Autor

ΔF508 fue el segundo alelo más común (37.1%), con una frecuencia (tabla 1) un poco mayor a la reportada en estudios anteriores en la población ecuatoriana¹⁸, aunque menor que la reportada en la mayoría de países latinoamericanos (figura 7). Estos datos pueden atribuirse a la distribución étnica que existe en los diferentes países, pues a diferencia de países como Argentina, que poseen un componente caucásico importante, Ecuador en sus dos terceras partes se compone de gente mestiza, con sólo una décima parte de raza blanca¹².

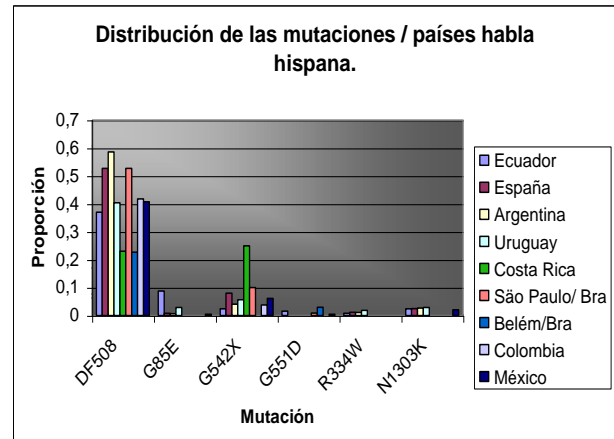
Figura 7



Fuente: Ecuador n: 62 pacientes (presente estudio), Colombia n: 92 pacientes (Keyeux *et al.*, 2003), Chile n: 57 pacientes (Repetto *et al.*, 2001), Argentina n: 220 pacientes (Visich *et al.*, 2002), Uruguay n 52 pacientes (Luzardo *et al.*, 2002), São Paulo n: 55 pacientes (Raskin, S. & Faez, F.R. 2001), Belém, North of Brazil n: 33 pacientes (De Araújo *et al.*, 2005), Costa Rica n: 24 pacientes (Venegas *et al.*, 2003), México n: 97 (Orozco *et al.*, 2000), España (Bobadilla *et al.*, 2002) artículo de revisión 13, 20, 24, 15, 19, 8, 23, 17, 3

La incidencia de la mutación G85E en nuestra población es mucho mayor a la reportada hasta el momento en cualquier estudio de distribución de mutaciones en el gen CFTR a nivel latinoamericano (figura 8), y más interesante aún a nivel mundial, mayor que la descrita en el sur de Grecia de donde se cree es originaria^{9,3}.

Figura 8



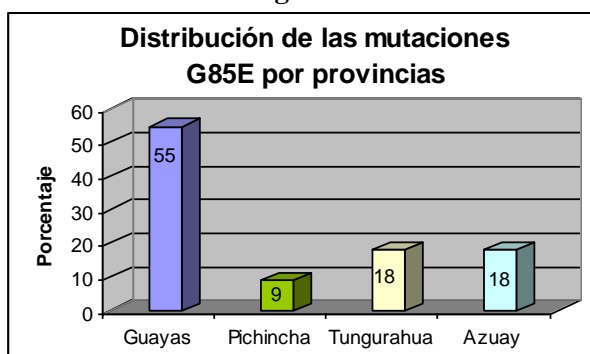
Fuente: Ecuador n: 62 pacientes (presente estudio), Colombia n: 92 pacientes (Keyeux *et al.*, 2003), Chile n: 57 pacientes (Repetto *et al.*, 2001), Argentina n: 220 pacientes (Visich *et al.*, 2002), Uruguay n 52 pacientes (Luzardo *et al.*, 2002), São Paulo n: 55 pacientes (Raskin, S. & Faez, F.R. 2001), Belém, North of Brazil n: 33 pacientes (De Araújo *et al.*, 2005), Costa Rica n: 24 pacientes (Venegas *et al.*, 2003), México n: 97 (Orozco *et al.*, 2000), España (Bobadilla *et al.*, 2002) artículo de revisión.

Es importante establecer que aunque nuestra historia narra que la mayoría de la población ecuatoriana es descendiente de españoles¹¹, este dato sería cuestionable según los datos encontrados en el presente trabajo, pues tanto ΔF508 como G542X, que son las dos principales mutaciones en España, se presentan en nuestro estudio en una proporción mucho menor (37.1% y 2.4% respectivamente)⁹, de manera que se podría pensar en la gran influencia que las poblaciones originarias indígenas han hecho a la reserva genética actual de la población ecuatoriana. Esta hipótesis es apoyada por el hecho que las mutaciones más frecuentes en nuestro país (ΔF508 37.1%, G85E 8.9%, G542X 2.4%, N1303K 2.4%, G551D 1.6% y R334W 0.8%) no concuerdan con las más frecuentes a nivel mundial y sus porcentajes, ΔF508 66,8%, G542X 2,6%, N1303K 1,6%, G551D 1,5%, y W1282X 1%⁹.

Resulta vital el señalar que la distribución de la mutación G85E es más uniforme alrededor de todo

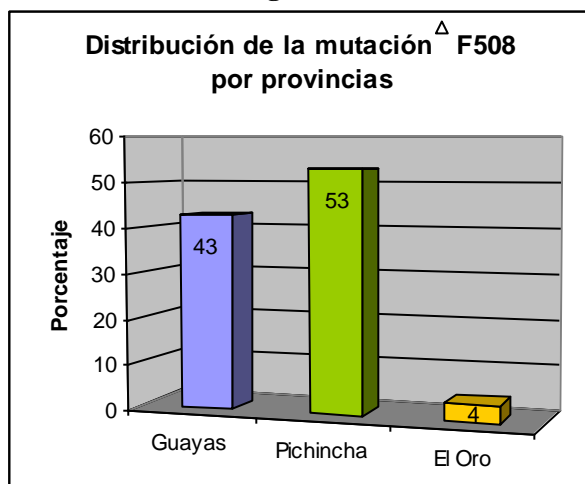
el Ecuador al compararla con la de $\Delta F508$ (figuras 9 y 10), pues aunque se presenta en menor número de pacientes, se distribuye en 4 de las 7 provincias de las que provinieron los pacientes y no solamente en 3 provincias como lo hace $\Delta F508$. De este modo, cabría pensar que de realizarse un estudio que comprenda mayor cantidad de pacientes con una distribución inter-provincial más homogénea, quizás se encuentre una incidencia de G85E aún más alta que la reportada en este estudio.

Figura 9



Fuente: Autor

Figura 10



Fuente: Autor

Si bien las pruebas moleculares son 100% sensibles y 100% específicas para lo que están estudiando, la sensibilidad de los métodos utilizados (heterodúplex e INNO-LiPA CFTR29 + Tn) en relación a la población ecuatoriana fue 53,22%, que representa el porcentaje de mutaciones que se pudieron encontrar. Aunque aceptable en relación a los resultados encontrados a nivel mundial³, este porcentaje plantea la

imprescindible necesidad de utilizar secuenciación para establecer ese gran porcentaje de mutaciones que permanecen como no conocidas (WT).

Conclusiones

- La incidencia estimada de la Fibrosis Quística en el Ecuador es 1:11,252 nacidos vivos.
- Los porcentajes de las mutaciones encontradas en la población ecuatoriana de pacientes con Fibrosis Quística son: $\Delta F508$ en 37.1%, G85E en 8.9%, G542X en 2.4%, N1303K en 2.4%, G551D en 1.6%, R334W en 0.8%.
- Según la bibliografía analizada en este trabajo, hasta el momento, la frecuencia de la mutación G85E (8,9%) encontrada en nuestro país es la más alta a nivel mundial, incluso mayor a la del sur de Grecia de donde se cree que es originaria dicha mutación.
- La sensibilidad de los métodos utilizados en este estudio (heterodúplex e INNO-LiPA CFTR 29 + Tn) en relación a la población es de 53,22%.

Recomendaciones

Poner a disposición de la comunidad los recursos del Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Guayaquil para el análisis molecular del gen CFTR.

Estudiar por el método de secuenciación los ADNs de los pacientes en los que no se pudo conocer la mutación, de manera que se pueda establecer ese gran porcentaje de mutaciones no encontradas, quizás propias de nuestra población.

Implementar políticas de salud pública idóneas para establecer la real incidencia de Fibrosis Quística en el país; existen claros indicios de la existencia de casos no diagnosticados.

Referencias bibliográficas

- Ahmed N, Corey M, Forstner G, Zielenski J, Tsui L-C, Ellis L, Tullis E, Durie P: Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. Gut 52: 1159–1164, 2003

2. Behrman R, Kliegman R, Jenson H, and Boat Thomas F: Cystic Fibrosis. Nelson textbook of pediatrics. 17ªed, Saunders, Philadelphia, Pennsylvania Chapter 393: 1437-1450, 2003
3. Bobadilla J, Macek MJ, Fine JP, Farrell P: Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations. Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human mutation* 19: 575-606, 2002
4. Borrajo G, Adam M, Castillo P, Lanz M, Di Carlo C, Gómez F, *et al*: Screening neonatal de fibrosis quística. Experiencia en más de 100.000 neonatos estudiados. In: *Proceedings of the IX Congreso Latinoamericano de Fibrosis Quística*. Sociedad Argentina de Pediatría, Buenos Aires 83, 1999
5. CF Foundation National patient Registry, Bethesda Maryland, 2000
6. Chernick V, Boat T, Kendig E, MacLusky I, Levison H: *Kendig's: Disorders of the respiratory tract in children*. 6ªed, Saunders Company, Philadelphia-Pensylvania 838-882, 1998
7. Curtis A, Nelson R, Porteous M, Burn J, Bhattacharya SS: Association of less common cystic fibrosis mutations with a mild phenotype. *J Med Genet* 28: 34-37, 1991
8. De Araujo FG, Novaes F, dos Santos N, Martins V, de Souza S, dos Santos S, Ribeiro-dos-Santos A: Prevalence of $\Delta F508$, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 11-15, 2005
9. Estivill X, Consol B, Ramos C: And the Biomed CF mutation Analysis Consortium: Geographic distribution and regional origin of 272 Cystic Fibrosis Mutations in European Populations. *Human Mutation* 10: 135-154, 1997
10. Gibson R, Burns J, and Ramsey B: State of the art: Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 918-951, 2003
11. Historia. Enciclopedia ecuatoriana LNS, Quinto grado. Ed Edibosco, Cuenca-Ecuador 377-404, 1991
12. INEC. Instituto nacional de estadísticas y censos. VI censo de población y V de vivienda, 2001
13. Keyeux G, Rodas C, Bienvenu T, Garavito P, Vidaud D, Sánchez D, Kaplan JC, Aristizábal G: CFTR mutations in patients from Colombia: Implications for local and regional molecular diagnosis programs. *Human Mutation*. Mutation in Brief #644. Online, 2003
14. Lebecque P, Leal T, De Boeck C, Jaspers M, Cuppens H, Cassiman JJ: Mutations of the cystic fibrosis gene and intermediate sweat chloride levels in children. *Am J Respiratory and Critical Care Medicine* 165: 757-761, 2002
15. Luzardo G, Aznarez I, Crispino B, Mimbacas A, Martínez L, Poggio R, Zielenski J, Tsui LC, Cardoso H: Cystic fibrosis in Uruguay. *Genetics and molecular research* 1 (19): 1-8, 2002
16. Miller SS, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16 (3): 1215, 1988
17. Orozco L, Velásquez R, Zielenski J, Tsui L, Chávez M, Lezana L, Saldaña Y, Hernández E, Carnavale A: Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G→A). *Human genetics* 106: 360-365, 2000
18. Paz-y-Miño C, Pérez JC, Burgos R, Dávalos MV, Leone P: The $\Delta F508$ mutation in Ecuador, South America. *Human mutation* 14: 348-350, 1999
19. Raskin S, Faez FR: Aspectos genéticos da fibrose cística. Doenças genéticas em pediatria. In: Carakushansky G. Guanabara Koogan, São Paulo, SP, Brazil, 2001
20. Repetto G, Poggi H, Harris P, Navarro H, Sánchez I, Guiraldes E, Rérez M, Boza M, Hunter B, Wevar M, Mediavilla M, Foradori A: Identificación de mutaciones en el gen CFTR en pacientes chilenos con fibrosis quística. *Rev Med Chile* 129 (8), 2001
21. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielinski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1072, 1989
22. Taussig L, Landau L: *Pediatric respiratory medicine. Cystic fibrosis*. Mosby. St. Louis, Missouri, Chapter 66-70: 982-1075, 1998
23. Venegas P, Novak J, Oscar C, Sánchez F, Gutiérrez I, Rivera J, Salas J, Montero J, Grody W: Cystic fibrosis mutations in Costa Rica. *Human Biology* 75 (2): 179-188, April 2003
24. Visich A, Zielenski J, Castaños C, Diez G, Grenoville M, Segal E, Barreiro C, Tsui L-C, Chertkoff L: Complete screening of the CFTR gene in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 61: 207-213, 2002
25. www.innogenetics.com. INNO-LiPA CFTR17+Tn. Kit for molecular identification of 17 mutations + Tn polymorfism in the CFTR gene, 2003

Dr. Édison Patricio Valle Giler
Correo electrónico: patovalleg@gmail.com
Teléfono: 593-04-2278462, 097324515
Fecha de presentación: 24 de febrero de 2006
Fecha de publicación: 20 de abril de 2006
Traducido por: Dra. Janet J. Moreno E.

