

Estudio de la relación entre el grupo sanguíneo eritrocitario ABO con los niveles del factor von Willebrand en pacientes diagnosticados con la enfermedad

► Josselyn Alejandra Proaño-Meneses^{1a}, Marcela Alejandra Mardones-Montanares^{2a}, Rosa F. Chiriboga-Ponce^{3a,b*}

¹ Bioquímica Clínica.

² Máster en Educación - Licenciada en Bioanálisis Clínico.

³ Máster en Salud Pública, Máster en Medicina Transfusional y Terapia Celular, Licenciada en Laboratorio Clínico.

^a Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

^b Centro de Investigación para la Salud en América Latina, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

* Autora para correspondencia.

Resumen

La presencia o ausencia de los antígenos del sistema ABO entre otros factores se han relacionado con los niveles plasmáticos del factor von Willebrand (VWF) debido a su influencia en la proteólisis por la ADAMTS 13; la actividad de este sistema eritrocitario puede incidir en eventos trombóticos o hemorrágicos. El propósito de este estudio fue determinar si los pacientes diagnosticados con la enfermedad de von Willebrand pertenecían al grupo sanguíneo O y si los niveles de VWF y FVIII eran más bajos que los de los grupos no-O. El grupo sanguíneo fue identificado por un método directo en tubo y el VWF y FVIII se midieron mediante ensayos de coagulación. Se analizó un total de 64 pacientes, el 29,4% eran mayores de 40 años, el 100% presentaron valores más bajos del VWF que los grupos no-O, el 64% de los pacientes presentaron una concentración del FVIII de 6-49% inferior al rango normal establecido y el 78,51% fueron tipificados como del grupo sanguíneo O. El análisis estadístico demostró una relación estadísticamente significativa entre los niveles de VWF y el grupo sanguíneo. Se determinó que existe una relación entre el sistema ABO y el VWF-FVIII ($p < 0,05$); sin embargo, esto no significa que sea la única causa de la existencia de un nivel bajo del factor. Estos datos indican la necesidad de mayores estudios en la población de pacientes con la enfermedad y la necesidad de determinar los tipos de von Willebrand y su relación con el grupo sanguíneo.

Palabras clave: Factor de von Willebrand; Grupo sanguíneo; Sistema ABO; Factor VIII

Study of the relationship between the ABO erythrocyte blood group with the von Willebrand factor levels in patients diagnosed with the disease

Abstract

The presence or absence of antigens of the ABO system, among other factors, have been related to plasma levels of von Willebrand factor (VWF) due to its influence on proteolysis by ADAMTS 13. The activity of this erythrocyte

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

system may influence on thrombotic or hemorrhagic events. The purpose of this study was to determine if the patients diagnosed with von Willebrand disease belonged to the O blood group and the VWF and FVIII levels were lower than those of the other blood groups. The blood group was identified by direct tube method and the VWF and FVIII were measured by coagulation tests. A total of 64 patients were analysed, 29.4% were older than 40, 100% presented lower values of VWF than the non-O groups. A total of 64% of the patients presented a lower concentration of 6-49% in FVIII at the established normal range and 78.51% were typified as blood group O. Statistical analysis showed a statistically significant relationship between VWF levels and blood group. It was determined that there is a relationship between the ABO system and the VWF-FVIII ($p < 0.05$). However, this does not mean that is the only cause of the existence of a low level of these factors. These data indicate the need for further studies in the population of patients with von Willebrand disease in order to determine the von Willebrand types and their relationship with the blood group.

Keywords: von Willebrand factor; Blood group; ABO system; FVIII

Estudo da relação entre o grupo sanguíneo eritrocitário ABO com os níveis do fator von Willebrand em pacientes diagnosticados com a doença

Resumo

A presença ou ausência dos antígenos do sistema ABO, entre outros fatores, tem sido relacionada aos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand (VWF) devido à sua influência na proteólise pelo ADAMTS 13; a atividade desse sistema eritrocitário pode afetar eventos trombóticos ou hemorrágicos. O objetivo deste estudo foi determinar se os pacientes com diagnóstico de doença de von Willebrand pertenciam ao grupo sanguíneo O e se os níveis de VWF e FVIII eram inferiores aos dos grupos não-O. O grupo sanguíneo foi identificado por um método direto em tubo e o VWF e o FVIII foram medidos por testes de coagulação. Foram analisados 64 pacientes, 29,4% tinham idade superior a 40 anos, 100% apresentaram valores mais baixos do VWF que os grupos não-O e 64% dos pacientes apresentaram concentração de FVIII 6-49% menor à faixa normal estabelecida, e 78,51% foram tipificados como do grupo sanguíneo O. A análise estatística mostrou uma relação estatisticamente significativa entre os níveis de VWF e o grupo sanguíneo. Foi determinado que existe uma relação entre o sistema ABO e o VWF-FVIII ($p < 0,05$), no entanto, isso não significa que seja a única causa da existência de um baixo nível do fator. Esses dados indicam a necessidade de novos estudos na população de pacientes com a doença e a necessidade de determinar os tipos de von Willebrand e sua relação com o grupo sanguíneo.

Palavras-chave: Fator de von Willebrand; Grupo sanguíneo; Sistema ABO; Fator VIII

Introducción

El factor de von Willebrand (VWF) es una glucoproteína sintetizada por células endoteliales y megacariocitos necesaria para el proceso de hemostasia por ser transportadora del factor VIII (FVIII) y promover la adhesión y agregación plaquetaria (1) (2). Los niveles plasmáticos varían significativamente y se ha asociado a varios factores como: el sistema ABO, niveles de estrógenos, edad, etnia y estrés. El estudio realizado por Sukhu *et al.* señala la existencia de una diferencia de concentración del antígeno de factor von Willebrand (VWF:Ag) y el factor VIII entre africanos, indios y caucásicos y destaca que los que presentaban un grupo sanguíneo O mostraban niveles significativamente más bajos que aquellos tipificados como grupo no-O (3). Se ha determinado que el sistema ABO tiene un efecto importante en los niveles plasmáticos del VWF. Estudios recientes en personas heterocigotas (AO, BO) establecieron que poseen valores más ba-

jos que los homocigotas para el antígeno A o B. Esto se debe a la proteólisis por la ADAMTS 13 y los individuos portadores del grupo sanguíneo O son más susceptibles (4). También se ha demostrado que los niveles del FVIII se encuentran afectados cuando existen cambios en los valores del VWF, pero su relación con el sistema ABO es aún controversial (1). Sin embargo, Song *et al.* sugirieron que los antígenos ABO influirían principalmente en la actividad FVIII, pero no exclusivamente a través del VWF (5). Klarmann *et al.* mencionaron que los antígenos AB protegen al VWF del aclaramiento y de la proteólisis, mientras que la protección del antígeno H presente en individuos de grupo sanguíneo O, es menos eficaz, por lo tanto, los niveles plasmáticos de VWF son aproximadamente el 25% inferiores que en los grupos no-O. Bajo esta teoría se pensaría que en los primeros años de vida, debido al desarrollo fisiológico del sistema de grupos sanguíneos ABO (H), los niveles de VWF serían bajos (6). Las investigaciones demostraron que

existe una influencia entre los niveles del VWF y FVIII circulante y el grupo sanguíneo (1). Sin embargo, las variaciones en los niveles del VWF puede deberse en un 66% a variaciones genéticas, mientras que en un 30% se las relaciona con efectos del grupo sanguíneo ABO. Además, se ha establecido que personas adultas de sangre del tipo O tienen una concentración entre un 25 y un 30% menor de VWF respecto a las de grupos A, B o AB. Este último ha sido considerado como el de mayor porcentaje en los niveles plasmáticos del VWF (7). Una de las explicaciones de esta concentración es debida al proceso de aclaramiento del VWF por la glicosilación durante su síntesis y la presencia de oligosacáridos de los antígenos de grupos sanguíneos A y B que aseguran la sobrevivencia del factor en circulación sanguínea (7). En los individuos de grupo O, al carecer de antígenos la glicosilación, está disminuida, por lo que se genera una mayor exposición a la enzima ADAMTS-13, que promueve el aclaramiento acelerado del VWF y por ende su disminución (7). En base a estos datos el propósito de este estudio fue identificar si los pacientes diagnosticados con la enfermedad de von Willebrand (VWD) eran con mayor frecuencia del grupo sanguíneo O y presentaban niveles más bajos de VWF y FVIII con respecto al grupo sanguíneo no-O.

Materiales y Métodos

Población

Se trató de un estudio descriptivo y transversal realizado en una muestra de 64 pacientes diagnosticados con la enfermedad de von Willebrand que procedían de 8 provincias ecuatorianas y de los cuales el 42% (27) eran hombres y el 58% (37) mujeres, entre 2 y 80 años. El 29,7% eran mayores de 40 años, el 20,3% del grupo etario 10-20 años y el 15,6% del grupo entre 21 y 30 años. La mayoría de los pacientes provenían de las provincias de Pichincha (42%) y Guayas (20,3%) (Tabla I).

Tabla I. Procedencia de pacientes con vW

Provincia	Pacientes	%
Azuay	9	14,1
Cotopaxi	2	3,1
El Oro	9	14,1
Guayas	13	20,3
Loja	1	1,6
Manabí	2	3,1
Pichincha	27	42,2
Santo Domingo	1	1,6
Total	64	100

Etapas preanalíticas

Para la toma de muestras sanguíneas se siguieron las recomendaciones del CLSI 2007, 2008a, 2008b. Se obtuvieron 2 tubos de cada paciente, uno en EDTA 2K (3 mL para adultos y 1 mL para niños) y otro con citrato de sodio 0,109 M (4 mL para adultos y 2 mL para niños). El tubo con EDTA 2K destinado para realizar la tipificación del grupo sanguíneo se almacenó y se transportó a 4 °C. El tubo con citrato fue centrifugado de forma inmediata a temperatura ambiente y a no más de 3500 r.p.m., para preservar el plasma. Se lo colocó en cuatro alícuotas de 500 µL cada una y se mantuvo a -22 °C. Finalmente se almacenó en ultracongeladora a -85 °C hasta su procesamiento.

Pruebas de control de calidad de los reactivos de tipificación sanguínea

Se realizaron pruebas de avidez, especificidad y potencia a los reactivos utilizados en tipificación sanguínea ABO, siguiendo los lineamientos establecidos por la Asociación Americana para Bancos de Sangre como parte del aseguramiento de la calidad.

Determinación del factor von Willebrand (VWF:Ag)

Se realizaron curvas de calibración para cada lote de reactivo utilizando el *Standard Human plasma* mediante diluciones de acuerdo al inserto y programación del equipo. Para la determinación se utilizó el *kit* de ensayo VWF:Ag de la marca Siemens, y las pruebas se realizaron en el coagulómetro *Sysmex CA 660* (Munich, Alemania). Se utilizaron controles internos normales y patológicos.

Determinación del factor VIII

Se utilizó *Standard Human plasma* para las calibraciones en cada lote de reactivos de acuerdo con las instrucciones del equipo. En cada corrida de las pruebas se utilizaron controles de dos niveles de marca BIORAD y como controles internos uno normal y otro patológico. Adicionalmente se utilizó un plasma deficiente en factor VIII de marca Siemens y tampón veronal *Owren*, Actin y cloruro de calcio. Las pruebas fueron realizadas en el coagulómetro *Sysmex CA 660* (Munich, Alemania).

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico en el programa SPSS *Statistics V.025*. Para la tabulación de los datos se utilizó estadística descriptiva y, para establecer la relación entre las variables, se calculó el *Chi* cuadrado y el coeficiente de correlación de Spearman.

Aspectos éticos

Se obtuvo la aprobación del Comité de Bioética CEISH-684-2019 y del Ministerio de Salud Pública MSP-DIS-2019-0190-O para la realización de esta investigación. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado previo a la toma de muestra.

Resultados

VWF:Ag

El 100% de los pacientes presentaron valores bajos respecto del rango de referencia (50-160%). Se obtuvo una media de 23,69% y una desviación estándar de 15,87. El resultado más bajo obtenido fue de 0,60% y el más alto de 49,10%. El 34% de los pacientes presentó niveles de VWF:Ag entre 30 y 49% y el 25% tuvo valores menores de 10% (Tabla II).

Tabla II. Frecuencia del VWF:Ag por niveles de detección

VWF:Ag	Frecuencia	%
30-49%	22	34
15-29%	14	22
10-14%	12	19
<10%	16	25
Total	64	100

Factor VIII

El análisis de datos determinó una media de 36,17% de FVIII, con una desviación estándar de 33,12. El 64% (41) de los pacientes presentaron una concentración de FVIII de 6-49% mientras que 20 (31%) tuvieron valores dentro del rango normal (Tabla III).

Tabla III. Frecuencia de resultados de FVIII

FVIII	Frecuencia	%
50-150%	20	31
6-49%	41	64
1-5%	3	5
Total	64	100

Tipificación sanguínea

Se identificó que el 78,1% (50) de los pacientes eran de grupo sanguíneo O y no se encontró ningún paciente con grupo B (Fig. 1). Al relacionar el grupo sanguíneo con los diferentes niveles determinados del VWF:Ag se identificó que en todos ellos existía una elevada prevalencia del grupo O (Fig. 2) y esta relación era estadísticamente significativa ($p < 0,05$) comparando los de grupo O con los no-O. Para el FVIII se realizó el mismo análisis. En 50 pacientes tipificados como O, más de la mitad tuvo resultados entre 1-45% de FVIII (valores inferiores al valor de referencia de personas sanas); sin embargo, 18 pacientes del grupo O tuvieron valores mayores que el rango de población normal de 50-150% (Tabla IV). Finalmente se relacionaron las pruebas de VWF:Ag y de FVIII. El valor obtenido de r de Spearman fue de 0,574, lo que indica que la correlación era positiva, es decir, que cuando los niveles de VWF bajan, los niveles de factor VIII, también tienden a bajar.

Tabla IV. Grupo sanguíneo ABO y FVIII

Grupo ABO	FVIII			Total
	50-150%	5-49%	1-4%	
A	2	11	0	13
AB	0	0	1	1
O	18*	30*	2	50
Total	20	41	3	64

* $p < 0,05$.

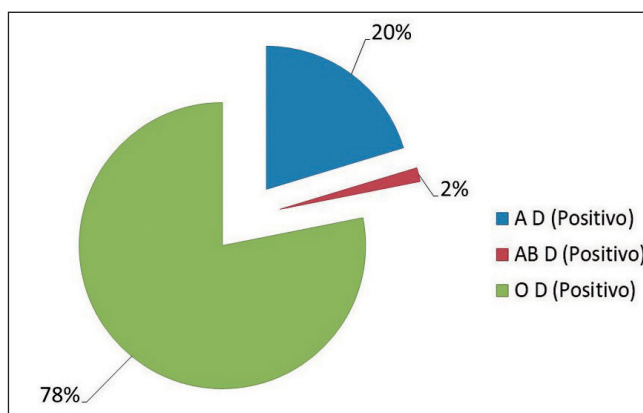


Figura 1. Frecuencia de grupos ABO y factor Rh

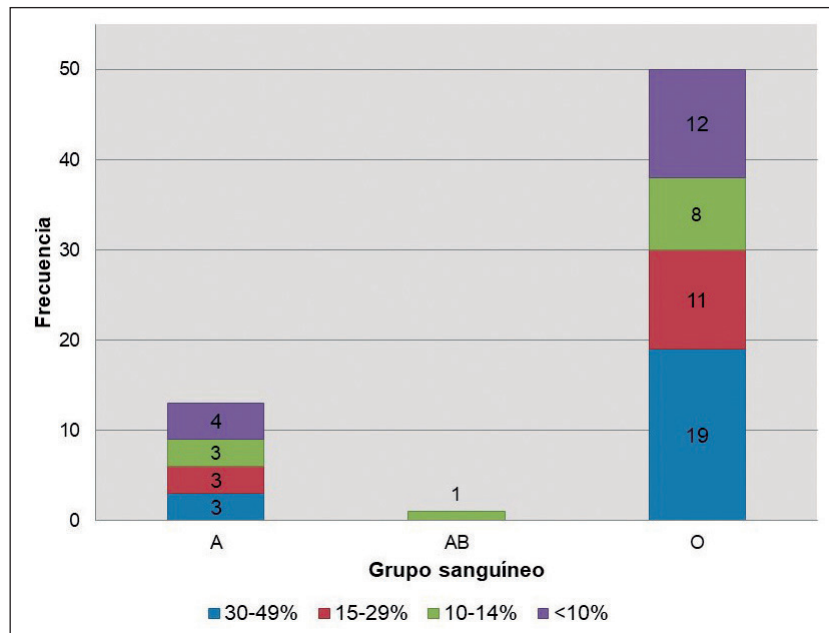


Figura 2. Grupo sanguíneo ABO vs. niveles del VWF

Discusión y Conclusiones

El sistema ABO representa aproximadamente el 30% de los determinantes genéticos que intervienen en el aclaramiento de los niveles plasmáticos del VWF; así, los individuos de grupo sanguíneo O poseen niveles más bajos de VWF en plasma (aproximadamente un 25% menos) que aquellos de otros grupos. De hecho se ha determinado que la presencia de antígenos A o B puede ejercer una función protectora para el aclaramiento y acción de la proteólisis por ADAMTS 13 (1). En el presente estudio se determinó que el 78% de los pacientes fueron identificados con grupo sanguíneo O y la mayoría presentaba niveles del VWF:Ag <10%. El análisis de correlación estadística fue significativo ($p < 0,05$) corroborando así la influencia del sistema ABO en el aclaramiento del VWF.

Márquez *et al.* también establecieron que existía una relación entre el sistema ABO y los niveles de VWF y además, su implicación directa en complicaciones hemorrágicas. De hecho, se estableció que existía un mayor riesgo de sangrado posparto en mujeres del grupo O, que se agudizaría al presentar otras coagulopatías (7). Franchini *et al.* concluyeron en su estudio que se requería de investigaciones para determinar los rangos normales de VWF y FVIII en la población para facilitar una apropiada detección de la enfermedad leve de von Willebrand, ya que la influencia de los fenotipos ABO es significativa en los niveles plasmáticos de VWF (8). Un estudio reciente sobre el efecto protector de los antígenos AB identificó que la presencia de los hidratos de carbono que dan lugar al fenotipo A afectaba la sus-

ceptibilidad de la ADAMTS 13 para el aclaramiento del VWF, es decir, tenía un efecto protector. Sin embargo, esto predispone a la formación de trombos y constituye un riesgo de enfermedades cardiovasculares. No ocurre lo mismo en individuos del grupo O que carecen de estos hidratos de carbono y se convierten en más sensibles a la proteólisis (4) (9). En resumen, los niveles de concentración del VWF están ligados a la secreción y aclaramiento, los que a su vez están influenciados por varios factores, entre ellos la edad. Se ha establecido que en individuos con VWD tipo 1 tienden a normalizarse en la edad avanzada e incluso aumentan los niveles en personas entre los 46 y 84 años (1) (10), pero la influencia del sistema ABO ha sido estudiada y demostrada. En el presente estudio el rango de edad fue de 2 a 80 años, el grupo etario más frecuente fue el de >40 años y se encontraron niveles del VWF de 30-49%, valores más bajos que el rango normal establecido.

Los hallazgos del presente estudio determinaron que los rangos de VWF son más bajos en los pacientes tipificados como O en relación a los no-O. Hayakawa *et al.*, identificaron que los niveles plasmáticos del VWF:Ag fueron significativamente diferentes entre los cuatro grupos ABO ($AB \geq B > A > O$) mientras que se mantenía el hallazgo de que en el grupo O eran más bajos (9).

Los resultados obtenidos en este estudio para el FVIII determinaron que 20 pacientes (31%) presentaban valores en rangos normales y 18 fueron tipificados como del grupo sanguíneo O. Sin embargo, otros 44 del grupo O (69%) presentaban niveles bajos de FVIII, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$).

La relación del grupo ABO con FVIII y VWF, de acuerdo con Gallinaro *et al.*, es atribuible a la supervivencia más corta del VWF en los individuos de grupo O, lo que promueve una velocidad más rápida de aclaramiento y, por ende, una disminución plasmática. Sin embargo, no se descarta que otros factores intervengan en la eliminación del VWF (11). En este estudio se determinó la relación entre los individuos del grupo O y los factores estudiados, pero esto no significa que sea la única causa de un nivel bajo del VWF. Así también se determinaron niveles normales del FVIII. Estos datos podrían indicar que se requieren estudios que permitan identificar si se trata de un tipo cualitativo o cuantitativo de la enfermedad de von Willebrand. Una de las limitaciones de este estudio fue la falta de acceso a un diagnóstico diferencial del tipo de enfermedad de von Willebrand que presentaban los pacientes.

Por otro lado, es indudable la importancia clínica que tiene el sistema ABO por su efecto hemostático que influye directamente en el VWF e indirectamente en el FVIII. Los estudios demostraron que en pacientes con von Willebrand es muy común la presencia del grupo sanguíneo O, hecho que sugiere que puede favorecer la presencia de este trastorno hemorrágico hereditario especialmente en el tipo I (8). Al igual que en este estudio, el 78% del total de pacientes diagnosticados con la enfermedad fueron tipificados como del grupo sanguíneo O. Una de las explicaciones de la influencia de los antígenos ABO es la presencia del antígeno H que influye directamente en los niveles bajos del VWF. La ausencia de hidratos de carbono no permite regular la susceptibilidad del VWF a la proteólisis por ADAMTS 13; sin embargo, el mecanismo de la influencia del grupo sanguíneo y los niveles plasmáticos de VWF no han sido definidos en su totalidad (12). Archer *et al.* sugirieron que conocer el grupo sanguíneo en pacientes pediátricos sería útil para el diagnóstico de verdaderos desórdenes hematológicos y evitar así el uso de paneles de pruebas para la determinación de la enfermedad de von Willebrand y su repetición para confirmar el trastorno (13). Esta propuesta está fundamentada en que las personas con grupo sanguíneo O tienen valores basales bajos de VWF. Sin embargo, este conocimiento no predice ser portador de la enfermedad ni tampoco asegura que individuos con ella tengan mayores o menores probabilidades de sangrar, pero sí alertaría de la presencia de niveles inferiores para su descarte inicial como VWD (13). Hayakawa *et al.* confirmaron que la estructura del antígeno A tenía un papel fundamental en la protección de la proteólisis de ADMATS 13, que mostraba un efecto mayor al de los antígenos B y H y que se ponía de manifiesto la relación estrecha entre el grupo sanguíneo del sistema ABO y el aclaramiento del VWF (9). En conclusión, en este estudio se observó la influencia del sistema ABO sobre los niveles del VWF, pero no se pudo identificar

como predictor de la enfermedad o causante del sangrado. Para ello se requerirá de nuevos estudios que establezcan la relación ABO-VWF y permitan contribuir al diagnóstico precoz.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Fundación Hemofílica Ecuatoriana (FUNDHEC) por el apoyo para la realización de este estudio.

Fuentes de financiación

Este proyecto fue financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Máster ROSA F. CHRIBOGA-PONCE
Avenida 12 de Octubre 1076 y Roca
QUITO - Ecuador
Correo electrónico: rfchiriboga@puce.edu.ec

Referencias bibliográficas

1. Albáñez S, Ogiwara K, Michels A, Hopman W, Grabell J, James P, *et al.* Aging and ABO blood type influence von Willebrand factor and factor VIII levels through interrelated mechanisms. *J Thromb Haemost* 2016 May; 14 (5): 953-63.
2. Pujol-Moix N, Martínez-Pérez A, Sabater-Lleal M, Llobet D, Vilalta N, Hamsten A, *et al.* Influence of ABO locus on PFA-100 collagen-ADP closure time is not totally dependent on the von Willebrand factor. Results of a GWAS on GAIT-2 project phenotypes. *Int J Mol Sci* 2019 Jun 30; 20 (13): 3221.
3. Sukhu K, Poovalingam V, Mahomed R, Giangrande PL. Ethnic variation in von Willebrand factor levels can influence the diagnosis of von Willebrand disease. *Clin Lab Haematol* 2003; 25 (4): 247-9.
4. Sousa NC, Anicchino-Bizzacchi JM, Locatelli MF, Castro V, Barjas-Castro ML. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. *Haematologica* 2007; 92 (2): 236-9.
5. Song J, Chen F, Campos M, Bolgiano D, Houck K, Chambliss LE, *et al.* Quantitative influence of ABO blood groups on factor VIII and its ratio to von Willebrand factor, novel observations from an ARIC study of 11,673 subjects. *PLoS One* 2015 Aug 5; 10 (8): e0132626.
6. Klarmann D, Eggert C, Geisen C, Becker S, Seifried E, Klingebiel T, *et al.* Association of ABO(H) and I blood

- group system development with von Willebrand factor and factor VIII plasma levels in children and adolescents. *Transfusion* 2010 Jul; 50 (7): 1571-80.
7. Márquez Y, Lancheros A, Díaz E. Grupos sanguíneos y su relación con los niveles plasmáticos del factor de von Willebrand. *Universidad y Salud* 2019; 21: 277-87.
 8. Franchini M, Crestani S, Frattini F, Sissa C, Bonfanti C. ABO blood group and von Willebrand factor: biological implications. *Clin Chem Lab Med* 2014 Sep; 52 (9): 1273-6.
 9. Hayakawa M, Kato S, Matsui T, Sakai K, Fujimura Y, Matsumoto M. Blood group antigen A on von Willebrand factor is more protective against ADAMTS13 cleavage than antigens B and H. *J Thromb Haemost* 2019 Jun; 17 (6): 975-83.
 10. Davies JA, Collins PW, Hathaway LS, Bowen DJ. Clearance *in vivo* according to Y/C1584 phenotype and ABO blood group. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (1): 97-103.
 11. Gallinaro L, Cattini MG, Sztukowska M, Padrini R, Sartorello F, Pontara E, *et al.* A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. *Blood* 2008; 111 (7): 3540-5.
 12. Ward SE, O'Sullivan JM, O'Donnell JS. The relationship between ABO blood group, von Willebrand factor, and primary hemostasis. *Blood* 2020; 136: 2864-74.
 13. Archer NM, Forbes PW, Brugnara C. Knowledge of blood group decreases von Willebrand factor panel testing in children. *Hemasphere* 2017; 1 (1): e3.

Recibido: 24 de junio de 2020

Aceptado: 10 de marzo de 2021