



ARTÍCULO ORIGINAL

Alteraciones genitales en la infección por leptospiras en ratas Wistar gestadas

Genital alterations in leptospiras infection in pregnant Wistar rats

Mariela Mosquera-Escobar¹✉ , Eilín Armas-González¹ , Katerinne Alvarez-González¹ , Madelen García-Otero¹ , Margot López-Alonso¹ , Rafaela Díaz-del Pino¹ 

¹Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Ernesto Che Guevara de la Serna". Pinar del Río, Cuba.

Recibido: 24 de febrero de 2022

Aceptado: 13 de marzo de 2022

Publicado: 28 de junio de 2022

Citar como: Mosquera-Escobar M, Alvarez-González E, Alvarez-González K, García-Otero M, López-Alonso M, Díaz-del Pino R. Alteraciones genitales en la infección por leptospiras en ratas Wistar gestadas. Rev Ciencias Médicas [Internet]. 2022 [citado: fecha de acceso]; 26(3): e5499. Disponible en: <http://revcmpinar.sld.cu/index.php/publicaciones/article/view/5499>

RESUMEN

Introducción: la leptospirosis en Cuba se presenta de forma endémica, y a veces de forma epidémica, por lo que es un problema de salud. Su efecto sobre los genitales internos, en gestantes, ha sido poco tratado por los investigadores.

Objetivo: describir las principales alteraciones en los genitales internos de ratas Wistar gestadas infestadas por leptospiras.

Métodos: se realizó un estudio experimental en ratas Wistar preñadas: siete grupos con tres animales cada uno: un control negativo y seis casos con dosis de una concentración bacteriana de 300 millones de Leptospiras por mL; se inocularon dos mililitros a cada animal al cuarto día de gestadas por 17 meses. Se tomaron los genitales internos de todas las ratas el día 20 de la gestación, estos fueron procesados en parafina y teñidos con hematoxilina/eosina.

Resultados: se observaron alteraciones en útero, ovarios y trompas; el mayor número de lesiones se presentaron en útero mientras que en ovarios y trompas se visualizaron la misma cantidad de lesiones.

Conclusiones: la leptospirosis infectó los genitales internos con la producción de quistes, necrosis, abscesos, ooforitis y microhemorragias en ovarios; congestión vascular y hemorragias en las trompas uterinas y endometritis, hemorragias, miometritis, piometritis, perimetritis y congestión vascular en el útero. Predominaron las alteraciones congestivas y hemorrágicas.

Palabras clave: Leptospirosis; Leptospira; Útero; Trompas Uterinas; Ovarios; Ratas Wistar

ABSTRACT

Introduction: leptospirosis in Cuba occurs endemically, and sometimes epidemically, making it a health problem. Its effect on internal genitalia in pregnant women has been little treated by researchers.

Objective: to describe the main alterations in the internal genitalia of pregnant Wistar rats infested by leptospirosis.

Methods: an experimental study was carried out in pregnant Wistar rats: 7 groups with three animals each: 1 negative control and 6 cases with doses of a bacterial concentration of 300 million *Leptospira* per mL; each animal was inoculated with two milliliters on the fourth day of pregnancy for 17 months. The internal genitalia of all rats were taken on day 20 of gestation, processed in kerosene and stained with hematoxylin/eosin.

Results: alterations were observed in the uterus, ovaries and tubes; the greatest number of lesions was present in the uterus while the same number of lesions was visualized in the ovaries and tubes.

Conclusions: leptospirosis infected the internal genitalia producing cysts, necrosis, abscesses, oophoritis and microhemorrhages in the ovaries; vascular congestion and hemorrhages in the uterine tubes and endometritis, hemorrhages, myometritis, pyometritis, perimetritis and vascular congestion in the uterus. Congestive and hemorrhagic alterations predominated.

Keywords: Leptospirosis; *Leptospira*; Uterus; Fallopian Tubes; Ovary; Rats, Wistar.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis, considerada enfermedad reemergente por la Organización Panamericana de la Salud, es una zoonosis que aún después de 125 años de su primera descripción, permanece como la de más amplia distribución mundial y la que mayores pérdidas ocasiona a la salud del hombre.^(1,2,3)

Se puede contraer cuando la bacteria que se encuentra en el suelo entra en contacto con el huésped al penetrar la piel lesionada o mucosas, y con aguas contaminadas con leptospirosis, que se define como la orina contaminada con *Leptospira* spp. Habitualmente esta enfermedad se presenta de manera leve en 90 a 95 % de los casos, y de forma grave en 5 a 10 %. Su diagnóstico es un reto debido a que las manifestaciones clínicas en la fase inicial son inespecíficas.^(4,5,6)

Este microorganismo generalmente penetra al organismo por las mucosas, conjuntivas, cortes pequeños, abrasiones, piel húmeda o directamente por vía oral al ingerir inconscientemente la bacteria y pasa por vía sanguínea a órganos parenquimatosos como hígado, bazo o riñón, permanece en lugares donde la actividad de anticuerpos es baja como humores oculares, útero y túbulos renales que se convierten en la principal vía de infección.^(4,5)

Es una enfermedad con alto riesgo de infección, por tal razón clasifica entre las 35 primeras causas de muertes a nivel mundial, si no se controla puede llegar a generar mortalidades humanas y animales, junto con cuantiosas pérdidas económicas, que se pueden deber al incremento de la incidencia de esta enfermedad, tanto en países desarrollados como en subdesarrollados.⁽⁴⁾

La leptospirosis en el embarazo aún no ha sido ampliamente estudiada. Se cree que los casos de leptospirosis en general y durante el embarazo no se notifican. Puede atribuirse a sus presentaciones sutiles, y a que puede simular condiciones asociadas al embarazo como el Síndrome HELLP (Hemólisis, Niveles elevados de Enzimas Hepáticas y Plaquetas Bajas, PET (Pre-Eclampsia) y AFLP (Hígado Graso Agudo del Embarazo) por lo tanto, contribuye aún más al problema de su diagnóstico.⁽⁷⁾

Si ocurre durante el embarazo es fatal. En una revisión de 16 casos, el aborto espontáneo predominó en los dos primeros trimestres. Cuando se presentó en el tercer trimestre, un tercio de los embarazos terminaron en aborto o muerte perinatal.⁽⁸⁾

Los resultados relacionados con los daños histológicos, anatómicos y embriológicos en útero, ovario y placenta de ratas Wistar gestadas han evidenciado la presencia en genitales internos de folículos quísticos en ovarios y congestión serosa tubular, el útero con endometrio secretor, y placenta con edema seroso e infiltrado inflamatorio agudo, en otros grupos de ratas Wistar infestadas por una serovariedad diferente se detectó en útero endometriosis proliferativa y crónica, congestión de los vasos de la serosa uterina, en ovarios cuerpo amarillo en retrogresión y folículos quísticos, congestión de la serosa tubular en áreas focales hemorrágicas.⁽⁹⁾

En estudios de otras especies como el ganado se ha demostrado que la leptospirosis bovina provoca abortos, muerte fetal, partos prematuros y nacimientos de terneros débiles y/o bajo peso, además en etapas tempranas se relaciona con infertilidad y muerte embrionaria temprana.⁽¹⁰⁾

La leptospirosis es causante de ictericia neonatal, la infección es transmitida trasplacentariamente con leptospirosis intrauterina que puede causar placentitis o placenta isquémica, con hemorragias, cuadro hepatorenal y puede terminar en la muerte, si el feto nace puede presentar desarrollo anormal. El feto puede estar en riesgo aun en caso de que la madre esté asintomática, especialmente en el primer y segundo trimestre ya que la inmunidad adaptativa del feto no funciona. El feto comienza a producir ciertos niveles de IgM durante el tercer trimestre, pero aun así puede haber una placenta isquémica que puede causar su muerte por lo que se recomienda un monitoreo del embarazo.⁽⁹⁾

En todo el mundo se han documentado más de 500 000 casos de leptospirosis grave por año, según la Organización Mundial de la Salud (OMS): establece que existe una probabilidad de 1 caso por cada 100 000 personas por año en climas templados y 10 casos por cada 100 000 personas por año en climas tropicales húmedos.^(4,5,11)

Con respecto a los reportes de Suramérica, Guyana, es el país que presenta mayor proporción de casos de leptospirosis, pues en dos reportes se identifican proporciones de 37 % y 60 % respectivamente; en Colombia, la prevalencia oscila entre el 6 y el 35 % en humanos; Por otra parte, se encontró una proporción del 8 % de casos en Brasil. En el Caribe; Jamaica presentó la mayor proporción de casos con un 31,9 %, seguido por Cuba con dos proporciones diferentes 27,6 % y 6,9 %.⁽⁵⁾

En Cuba, se cuenta desde 1981 con un Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis que abarca tanto a la salud humana como animal, el que se perfeccionó a partir de 1997, donde se enfatiza en la necesidad de fortalecer la prevención primaria.^(1,11)

En la provincia de Pinar del Río existe una tendencia descendente, de la morbilidad y mortalidad de la leptospirosis, sin embargo, la prevalencia de factores de riesgo que vulneran a la población, de acuerdo con las condiciones climatológicas, epidemiológicas y medioambientales hace que no se logren resultados estables en la disminución de la tasa de incidencia, lo que implica ofrecer alternativas viables desde una perspectiva integral y participativa.⁽¹⁾

Por otra parte, Cuba registró una tasa de mortalidad infantil de 7,6 por mil nacidos vivos en el año 2021,⁽¹²⁾ lo que demuestra que preservar el bienestar de todas las embarazadas, puérperas e infantes del país es una prioridad mantenida del Estado Cubano y su Sistema Nacional de Salud, por lo que evitar infecciones como la leptospirosis, durante el embarazo que puedan afectar la madre y el producto de la concepción es de importancia suprema para el sector de la salud.

Por todo lo anterior, se decide realizar este estudio con el objetivo de describir las principales alteraciones en los genitales internos de ratas Wistar gestadas, infestadas por leptospiras.

MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental, en la Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río, en un modelo animal de ratas Wistar, entre septiembre 2016 y febrero 2018. El estudio fue conducido y se rigió por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el cuidado, uso y reproducción de los Animales para la Experimentación del CENPALAB. Se escogió la rata por la factibilidad de su manejo, número de fetos, factibilidad económica de tenencia y manutención; además, presenta corto tiempo de gestación y estabilidad genética. Se utilizó la raza Wistar por su factibilidad al momento de la investigación.

Todas las hembras fueron alojadas en grupos de tres por caja en seis cajas las que fueron infestadas y un grupo control sano y los machos a razón de dos por caja. Antes del apareamiento los machos fueron ubicados individualmente. Posterior al apareamiento, las hembras presuntamente gestadas, se alojaron a razón de uno por caja hasta el final del estudio. Las cajas eran plásticas con tapa de rejilla (INPUD) y se ubicaron en estantes.

Se mantuvieron con encamado de bagazo de caña desmeollado esterilizado en autoclave (POT 01.01.05.003) en la Dirección de Animales Gnotobióticos.

La alimentación fue con dieta comercial granulada esterilizable EAO: 1004 (Cenpalab, AlyCo®) para roedores, con Certificado de Calidad, que se suministró a libertad durante el estudio. El agua se esterilizó (POT 05.01.06.021) y se suministró a libertad, en frascos de 250 y 500 mL.

Para el estudio se utilizaron 21 hembras, en dos oportunidades cada una de las dos veces que se repitió el experimento, se seleccionaron y distribuyeron aleatoriamente según el POT 05.01.03.002 en seis grupos experimentales y se empleó el programa Labtools, se les administró la serovariedad de leptospira.

Los machos fueron utilizados en el estudio como sementales solamente, por lo que no fueron distribuidos en los grupos experimentales, ni recibieron la administración de la leptospira.

Todas las ratas se gestaron, esto se comprobó a través de los métodos descritos por los investigadores del CENPALAB. Durante cada periodo del estudio (hembras gestadas alojadas en grupos de 1 por caja), las mismas se identificaron por grupos mediante tarjetas en las cajas (POT 05.02.01.020) donde se registró la identificación del animal con números, el código, tipo y grupo de ensayo, especie, línea, sexo, edad, fecha de comienzo (día 0), y las fechas de la primera, segunda y tercera semana de gestación y serovariedad de leptospira inoculada.

La sustancia de los ensayos fueron inóculos de una concentración bacteriana de 300 millones de leptospiras por mL, a razón de dos mililitros a cada animal por vía intraperitoneal (IP) al cuarto día de gestadas.

Se sacrificaron todos los animales luego de realizarse la cesárea a los 20 días de gestadas. Para ello se narcotizaron con éter dietílico.

Se extrajeron los genitales internos de todas las ratas, identificados por cada grupo de estudio y se realizó la fijación en formalina tamponada al 12 % por no más de 24 horas, se trataron con alcoholes a concentraciones crecientes, se aclararon con xilol y se procesaron por el método de inclusión en parafina; al final se obtuvieron los cortes hísticos mediante micrótopo con cuchilla de acero. Los portaobjetos de vidrio con el tejido fueron teñidos con hematoxilina/eosina y se observaron las láminas mediante microscopía óptica de campo brillante.

RESULTADOS

Se encontró que en las ratas Wistar, infectadas con leptospiras, las alteraciones que predominaron en ovario fueron los quistes (36,11 %), seguidos de microhemorragia ovárica (33,33 %). (Tabla 1)

Tabla 1. Alteraciones histopatológicas de ovarios en ratas Wistar gestadas, con leptospirosis. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. 2016-2018.

Alteraciones histopatológicas (n = 36)	No	%
Quistes ováricos	13	36,11
Necrosis ovárica	5	13,89
Absceso ovárico	5	13,89
Microhemorragia ovárica	12	33,33
Ooforitis	9	25,00

Las trompas uterinas fueron afectadas con predominio de la congestión vascular en el 66,67 %. (Tabla 2)

Tabla 2. Alteraciones histopatológicas en trompas.

Alteraciones histopatológicas (n = 36)	No	%
Congestión vascular tubárica	24	66,67
Hemorragia tubárica	20	55,56

Se demostró un predominio de la congestión vascular en un 80,56 %. La endometritis y la hemorragia uterina también estuvieron presentes en más del 50 % de la muestra estudiada. (Tabla 3)

Tabla 3. Alteraciones histopatológicas en útero.

Alteraciones histopatológicas en útero (n = 36)	No	%
Congestión vascular uterina	29	80,56
Endometritis	24	66,67
Hemorragia uterina	23	63,89
Miometritis	10	27,78
Piometra	8	22,22
Perimetritis	4	11,11

DISCUSIÓN

La información publicada sobre el efecto de la leptospirosis materna en el embarazo es limitada. Los resultados obtenidos llevan al análisis de los graves daños que la infección leptospiral puede causar en la madre. Al conocer que las principales alteraciones de los genitales internos que se pueden presentar en una rata Wistar preñada con leptospirosis son la congestión vascular y las hemorragias, se deduce que estas lesiones pudieran tener la misma causa que la descrita al estudiar el efecto de este germen en otras estructuras del organismo.

Las leptospiras penetran activamente a través de la mucosa, rasgaduras, corte o abrasiones o por la piel dañada, se esparcen en los intersticios y los líquidos orgánicos (sangre, linfa, líquido cerebrospinal), circulan y se multiplican en las células sanguíneas durante los primeros siete días. Más tarde, leptospiras en la sangre y los fluidos y los tejidos ricos en sustancias nutrientes llegan a un número crítico, lo que produce lesiones no definidas con sus toxinas o componentes celulares tóxicos que traen como consecuencia manifestaciones clínicas.⁽¹³⁾

Cedillo Sánchez y colaboradores estudiaron la asociación de quistes foliculares ováricos con la presencia de anticuerpos y agentes causantes de las principales enfermedades infecciosas reproductivas en vacas, y detectaron la presencia, en los quistes de ovario diagnosticados, de anticuerpos a la *leptospira interrogans*.⁽¹⁴⁾

En las infecciones con *Leptospira hardjo-prajitno* también en bovinos, Romero Becerra y Veloza demostraron que estas leptospiras tienen predilección por el tracto genital, considerada como una causa importante de infertilidad en este animal. La infertilidad se manifiesta como aumento de los servicios por concepción y prolongados intervalos entre partos. La presencia de *Leptospira* en el útero y los oviductos de las vacas infectadas interfiere con la implantación del embrión u otros eventos tempranos de la preñez. Además, se detectaron títulos de este serovar en orina, tejido renal, líquido folicular y complejo ovocito-cumulus, lo cual indica que las *Leptospiras* pueden infectar el ovario y posteriormente ser transmitidas al oviducto después de la ovulación.⁽¹⁵⁾

Normalmente, el útero cuenta con barreras anatómicas como el cérvix, que evita el paso de microorganismos desde la vagina y, además, con barreras inmunológicas locales, como la producción de inmunoglobulinas encargadas, entre otras, de impedir la fijación de bacterias al endometrio al convocar su fagocitosis. Sin embargo, durante algunas fases del ciclo estral, estos mecanismos defensores se ven afectados tanto por cambios en el pH intrauterino como por la actividad hormonal inmediata —como ocurre con la progesterona— sobre las células polimorfonucleares (PMN) y leucocitarias. Así, permite una invasión uterina por agentes infecciosos y su consecuente respuesta inflamatoria.⁽¹⁶⁾

Las alteraciones internas histológicas en las ratas inoculadas con alguna serovariedad presentaron esterilidad, pérdida del embarazo en los primeros días de la inoculación, hemorragias en un cuerno uterino y placenta edematosa, cuerno sin gestar atrofiado, y otros. Otras cepas provocaron infertilidad, muerte perinatal de las crías y muerte de la madre, profusas hemorragias. Se evidenciaron con otras cepas, parto prematuro, y en todas las crías, bajo peso al nacer con trastornos hemorrágicos en las extremidades.⁽¹⁴⁾

Se concluye que las principales alteraciones en los genitales internos de ratas Wistar gestadas, infestadas por leptospiras que se observaron fueron quistes, necrosis, abscesos, ooforitis y microhemorragias en ovarios; congestión vascular y hemorragias en las trompas uterinas y endometritis, hemorragias, miometritis, piometritis, perimetritis y congestión vascular en el útero. Predominaron las alteraciones congestivas y hemorrágicas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Todos los autores participaron en la conceptualización, análisis formal, administración del proyecto, redacción - borrador original, redacción - revisión, edición y aprobación del manuscrito final.

Financiación

Los autores no recibieron financiación para el desarrollo de la presente investigación.

Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en: www.revcompinar.sld.cu/index.php/publicaciones/rt/suppFiles/5499

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Díaz Alfonso H, Padrón González O, Lorenzo Díaz JC. Leptospirosis humana: una estrategia de superación. Rev Ciencias Médicas [Internet]. 2018 Feb [citado 02/02/2022]; 22(1): [aprox. 8 p.]. Disponible en: https://redib.org/Record/oai_articulo1387734-leptospirosis-humana-una-estrategia-de-superaci%C3%B3n
2. Calderón-Sierra DM, Jaimes-Bernal CP, Pedraza-Bernal AM. Comportamiento epidemiológico de la leptospirosis humana en Colombia, 2012-2016. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2019 Ago [citado 02/02/2022]; 71(2): e364. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602019000200001&lng=es.
3. Ricardo T, Monje LD, Landolt N, Chiani YT, Schmelting MF, Beldoménico PM, et al. Primer informe de Leptospira interrogans en el roedor sigmodontino Scaeteromys aquaticus. Rev Panam Salud Pública [Internet]. 2018 [citado 02/02/2022]; 42(1): e83. Disponible en: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.83>
4. Bautista TB, Bulla CD, López BH, Díaz AA, Pulido MM. Leptospirosis: enfermedad de importancia en salud pública. Rev Colombiana Cienc Anim. Recia. [Internet]. 2019 [citado 02/02/2022]; 11(2): [aprox. 9 p.]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2027-42972019000200108&lng=en&nrm=iso
5. Carranza Zamora AJ, Chang Fonseca D, Gutierrez López Y. Leptospirosis y enfermedad de Weil. Rev.méd.sinerg. [Internet]. 2020 [citado 02/02/2022]; 5(3): e346. Disponible en: <https://revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/view/346>
6. Aranzazu Ceballos AD, Apraez Henao L, Ortiz Marín DC. Leptospirosis en pediatría, un diagnóstico a tener en cuenta. Rev. chil. infectol [Internet]. 2020 Dic [citado 02/02/2022]; 37(6): [aprox. 10 p.]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182020000600728&lng=es.
7. Selvarajah S, Ran S, Roberts NW, Nair M(2021) Leptospirosis in pregnancy: A systematic review. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2021[citado 02/02/2022];15(9): e0009747. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009747>
8. Gompf SG. Drugs and Diseases: Infections diseases. Leptospirosis Medscape [Internet]; 2021 [citado 02/02/2022]. [aprox. 5 p.]. Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/220563-overview#a7>
9. Lemus Quintana JM, Cabezas Alfonso HC, Zaldivar Garit I, Armas González E, Ramos Chang Y. Observaciones clínico patológicas en ratas Wistar gestadas infectadas experimentalmente con leptospirosis. Rev Ciencias Médicas [Internet]. 2017 Jun [citado 09/02/2022]; 21(3): [aprox. 8 p.]. Disponible en: <http://www.revcmpinar.sld.cu/index.php/publicaciones/article/view/3020>
10. Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*. [Internet]. 2019 Sep [citado 02/02/2022]; 141(1): [aprox. 6 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>

11. Hernández-Cabezas M. Leptospirosis humana: un abordaje epidemiológico desde los factores ambientales. *Revista Cubana de Medicina General Integral* [Internet]. 2017 [citado 02/02/2022]; 33(1): [aprox. 4 p.]. Disponible en: <http://www.revmgi.sld.cu/index.php/mgi/article/view/263>
12. Ministerio de Salud Pública República de Cuba [Internet]. Cuba: PAMI; 2022[actualizado 02/01/2022; citado 12/02/2022]. [aprox. 1 p.]. Disponible en: <https://salud.msp.gob.cu/category/pami/>
13. Andre -Fontaine G, Aviat F, Thorin C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Curr Microbiol.* [Internet]. 2015 Jul [citado 02/02/2022]; 71(1): [aprox. 6 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003629>
14. Cedillo Sánchez LC, Banda Ruiz VM, Morales Salinas E, Villagómez Amezcua E. Asociación de quistes foliculares ováricos con la presencia de anticuerpos y agentes causantes de las principales enfermedades infecciosas reproductivas en vacas. *Rev Aban Veterin* [Internet]. 2012 Ene [citado 02/02/2022]; 2(1): [aprox. 12 p.]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/abanico/av-2012/av121b.pdf>
15. Romero Becerra LR, Veloza LC. Leptospirosis bovina como causa de enfermedad reproductiva. *Rev Sist Prod Agroecol.* [Internet]. 2014 Dic [citado 02/02/2022]; 5(2): [aprox. 28 p.]. Disponible en: <https://revistas.unillanos.edu.co/index.php/sistemasagroecologicos/article/view/657>
16. Sánchez-Sáenz LC, Brieva-Rico C, Díaz-Quiroga CC. Endometritis supurativa en una tití gris (*Saguinus leucopus*) en cautiverio: reporte de caso. *Rev Med Vet.* [Internet]. 2020 [citado 02/02/2022]; (41): 57-69. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542020000200057