

Detección de *stem cell* leucémica (CD26+) en pacientes con leucemia mieloide crónica con diferente respuesta molecular

Detection of leukemic stem cell (CD26+) in patients with chronic myeloid leukemia with different molecular response

Bengió RM¹, Peña M¹, Palacios F¹, Moiraghi B², Negri Aranguren P³, Enrico A⁴, Mariano R⁵, Toloza MJ⁶, Larripa I⁶.

¹ Inst. Invest. Hematológicas (IIHEMA), Academia Nac. Medicina de Bs. As.

² Servicio Hematología Hospital Ramos Mejía, CABA

³ Inst. Privado Hematología y Hemoterapia, Paraná, Entre Ríos

⁴ Hospital Italiano de La Plata, Prov Bs. As.

⁵ Hospital San Martín, Paraná, Entre Ríos

⁶ Inst. Medicina Experimental (IMEX), CONICET- Academia Nac. Medicina de Bs. As.

irenelarripa@gmail.com

Fecha recepción: 20/3/2022

Fecha aprobación: 31/3/2022

TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN ORAL A PREMIO DURANTE EL XXV CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA.



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 26 n° 1: xx-xx
Enero - Abril 2022

Palabras claves: LMC,
Stem Cell Leucémica,
CD26+,
Respuesta Molecular Profunda.

Keywords: CML,
Leukemic Stem Cell,
CD26+,
Deep Molecular Response.

Resumen

La leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por la t(9;22)(q34;q11), generando el gen de fusión *BCR-ABL1* que codifica la oncoproteína P210 con actividad constitutiva de tirosina kinasa. Los pacientes que presentan una profunda y sostenida respuesta molecular a los inhibidores de tirosina kinasa (ITK) pueden interrumpir el tratamiento. Sin embargo, aproximadamente el 50% de los casos presentan recurrencia molecular, probablemente debido a la persistencia de la *stem cell* leucémica (SCL) quiescente (no replicativa, transcripcionalmente silente). Recientes publicaciones han demostrado que la expresión de la enzima dipeptidil peptidasa IV (CD26) está restringida a la fracción CD45+/CD34+/CD38- de la SCL en LMC y no se ha detectado en otras SCL mieloides/linfoides ni en medula ósea normal. Por

esta razón CD26 es considerado un nuevo y específico bio-marcador de LMC.

El objetivo del trabajo fue detectar las SCL CD26+ en pacientes con LMC con diferente respuesta molecular (RM) y determinar si estas células persisten aun en casos con respuesta molecular profunda (RMP).

Se analizaron 193 muestras de pacientes con LMC (107 sexo masculino y 86 femenino) para evaluar la SCL mediante citometría de flujo usando el panel de anticuerpos monoclonales: CD45, CD34, CD38, CD26, CD117, CD123, CD3 y HLA-DR. En paralelo se realizó el estudio de la respuesta molecular mediante qRT-PCR *BCR-ABL1* (Método *Taqman*). Ambos estudios se realizaron en simultáneo en la misma muestra, durante el seguimiento en diferentes momentos bajo tratamiento con ITK (imatinib, nilotinib o dasatinib).

Los pacientes con una reducción de *BCR-ABL1* \geq a 3 log tenían una significativa menor proporción de casos con SCL CD26+ comparado con aquellos que tenían <3 log de reducción de los transcritos ($p < 0.0003$, OR: 3.4, 95% CI: 1,7 - 6,8). Considerando los 76 casos con RMP (33 RM4.0; 38 RM4.5 y 5 RM5.0), solamente 12/76 (16%) mostraron persistencia de la SCL CD26+. La presencia de la SCL CD26+ se redujo acorde aumenta la profundidad de la RM: 21%, 13% y 0% en RM4.0, RM4.5 y RM5.0 respectivamente.

Nuestros resultados muestran que los pacientes con buena RM (≥ 3 log), se asociaron con baja proporción de casos con SCL CD26+. Cuando la detección de SCL se evaluó exclusivamente en los casos con RMP, se observó que el decrecimiento de la SCL se asoció a mayor profundidad de la RM. La *stem cell* leucémica es altamente quiescente por lo cual podría estar presente aun en casos con respuesta molecular indetectable. En nuestro estudio la persistencia de SCL fue del 16% en casos con respuesta molecular profunda, indicando que la SCL persiste a pesar de la RM alcanzada. Este nuevo abordaje investigando la SCL podría ser útil en el seguimiento a largo plazo y de gran importancia en la evaluación de la recurrencia molecular en los casos incluidos en protocolos de discontinuación.

Abstract

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is characterized by the reciprocal translocation t(9;22)(q34;q21) resulting in the *BCR-ABL1* fusion gene encoding the P210 oncoprotein with a constitutive tyrosine kinase (TK) activity. It is known that patients with at least two years in deep and sustained molecular response could stop TK inhibitor (TKI) treatment. However, half of them show molecular recurrence, probably due to the persistence of transcriptionally quiescent leukemic stem cells (LSC). Recent studies show that the expression of the enzyme dipeptidylpeptidase IV (CD26) is mainly restricted to the CD45+/CD34+/CD38- fraction in CML LSC, and it is not found in other myeloid/lymphoid LSC or in normal bone marrow. For this reason, CD26 is considered a novel specific biomarker in CML.

The aim of this study was to detect the CD26+ LSC in CML patients with different molecular responses (MR) and to assess if these cells remain even in deep molecular response (DMR).

We have evaluated 193 CML patients (107 males and 86 females) for detection of LSC by flow cytometry using the panel: CD45, CD34, CD38, CD26, CD117, CD123, CD3 and HLA-DR and the *BCR-ABL1* quantification by qRT-PCR (Taqman method). Both studies were carried out simultaneously on the same sample, during the follow up at different time points under TKI treatment (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib). Patients with ≥ 3 *BCR-ABL1* log reduction had a significantly lower percentage of cases with CD26+ LSC compared with those who had < 3 log reduction ($p < 0.0003$, OR: 3.4, 95% CI: 1,7 - 6,8). Out of the 76 patients with DMR (33 in MR4.0, 38 in MR4.5 and 5 in MR5.0) only 12/76 (16%) showed persistence of CD26+ LSC. Furthermore, the presence of CD26+ LSC decreased accordingly to the achieved DMR: 21%, 13% and 0% in MR4.0, MR4.5 and MR5.0 respectively, without significant differences.

Our results show that patients with good MR (≥ 3 log) were significantly associated with a lower proportion of cases with LSC presence. When the LSC analysis was performed exclusively in cases with DMR, we observed that the decrease of LSC accompanied the deepness of the molecular response. Since the LSC is highly quiescent, it could be present even in cases with undetectable MR. In our study persistence of LSC in cases with DMR was 16%, indicating that these cells remain despite the MR achieved. This new approach to the study of the LSC could be useful in long-term follow-up and of great importance in the evaluation of molecular recurrence in cases included in discontinuation protocols.

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa clonal caracterizada por la adquisición de una translocación cromosómica específica denominada cromosoma Philadelphia (Ph⁺) [t(9;22)(q34;q11)]⁽¹⁾. Esta alteración citogenética produce el gen de fusión *BCR-ABL1*, que origina una proteína oncogénica, p210^{BCR-ABL} con actividad constitutiva de tirosina kinasa⁽²⁾. El estudio de la funcionalidad de esta proteína derivó en el desarrollo de los inhibidores de tirosina kinasa (ITK), los cuales determinaron un cambio revolucionario en el tratamiento de la LMC^(3,4). Recientemente se ha demostrado que los pacientes con respuesta molecular profunda y sostenida pueden ser incluidos en protocolos de discontinuación del tratamiento bajo

controles estrictos de *BCR-ABL1* cuantitativo. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los casos que interrumpen la terapia con ITK presentan recurrencia de transcriptos *BCR-ABL1* con pérdida de la respuesta molecular mayor, lo cual implica la reiniciación del tratamiento^(5,6). Es probable que la recaída después de la discontinuación del tratamiento se deba a la persistencia de *Stem Cell* Leucémicas (SCL) quiescentes que son transcripcionalmente silentes y sobreviven indefinidamente en nichos hipóxicos⁽⁷⁾. Tratando de identificar nuevos marcadores que permitan caracterizar la SCL de la LMC respecto de otras neoplasias mieloides o de la *stem cell* hematopoyética (SCH) normal se realizaron estudios con *microarray* evaluando la expresión de numerosos marcadores de superficie en el compartimento celular primitivo [CD34⁺/CD38⁻]. De todos los antígenos de superficie examinados la enzima CD26 o dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) resultó ser la más específica, dado que se identificó en todos los casos con LMC, no detectándose en la SCH normal ni en las SCL de otras neoplasias mieloides. Indicando que CD26 se comporta como un robusto y específico marcador de SCL de LMC^(8,9).

CD26 se expresa tanto en médula ósea (MO) como en sangre periférica (SP)⁽¹⁰⁾, lo cual permite el análisis de la SCL empleando citometría de flujo en muestras de SP evaluando la co-expresión de CD26 en el compartimento celular primitivo [CD45⁺/CD34⁺/CD38⁻]

También he podido demostrar que la SCL de la LMC expresa varios antígenos de superficie (CD44 y CXCR4 o CD184) que participan de las interacciones con el microambiente medular mediante el SDF-1 (Stromal Derived Factor1) liberados por las células del estroma medular. Ensayos funcionales han determinado que CD26 se comporta como una enzima que impide la asociación entre SDF1-CXCR4, degradando el SDF1 (ligando de CXCR4). Lo cual facilita el escape y movilización extramedular de la SCL en la LMC^(8,11,12).

Actualmente el seguimiento de la respuesta al tratamiento con ITK en LMC se realiza mediante el estudio de la cuantificación de los transcriptos *BCR-ABL1* por técnicas de qRT-PCR en tiempo real. Esta metodología permite definir la respuesta al tratamiento (óptima, *warning* o fallo), teniendo en cuenta los criterios del European Leuk Net^(4,13).

Si bien la cuantificación de los transcriptos *BCR-ABL1* es uno de los criterios fundamentales en

el seguimiento de esta patología, trabajos actuales sugieren que la identificación de la SCL a lo largo de la evolución de la enfermedad sería sin duda un parámetro muy importante a tener en cuenta en la respuesta y recurrencia de la enfermedad luego de la discontinuación del tratamiento.

Objetivo

Investigar la presencia de las SCL CD26+ en pacientes con LMC con diferente respuesta molecular y determinar si estas células leucémicas persisten aún en los casos con respuesta molecular profunda (RMP) y/o indetectable.

Materiales y Métodos

Se analizaron muestras de sangre periférica (SP) extraídas con EDTA de 193 pacientes adultos, mayores a 18 años, 107 varones y 86 mujeres con diagnóstico de LMC en tratamiento con ITK de primera y segunda generación. La edad media fue 48 años, rango 18-82. Las muestras de los pacientes se evaluaron en diferentes etapas de la evolución de la enfermedad y provinieron del IIHEMA y de Instituciones derivantes. Se realizaron estudios moleculares de seguimiento de Real Time PCR (qRT-PCR) para cuantificar los transcriptos *BCR-ABL1*. En paralelo se efectuó el análisis por citometría de flujo para evaluar el compartimento celular CD45⁺/CD34⁺/CD38⁻/CD26⁺ correspondiente a la SCL de la LMC.

La extracción del ARN se llevó a cabo con el método del Trizol. La respuesta molecular (RM) en escala internacional respecto del gen control *ABL1* se realizó utilizando el kit Molecular MD y el termociclador Rotor gene (Qiagen). Por Citometría de Flujo se evaluó la expresión del antígeno CD26 (enzima dipeptidilpeptidasa IV, DPPIV) en células *stem* totales (CD45⁺/CD34⁺/CD38⁻). Para la adquisición de las muestras marcadas se utilizó el citómetro de flujo FACS CANTO II (BD); FACS DIVA (versión 8, BD Biosciences). El panel utilizado incluye los siguientes anticuerpos: CD45 (V450 clon 2D1), CD34 (PERCP Cyanina 5.5, clon 8G12), CD38 (FITC, clon HB7) y CD26 (PE L272).

Consideraciones éticas: Los pacientes firmaron un consentimiento informado donde se indica la confidencialidad de toda la información de este estudio según pautas de la legislación nacional e internacional vigente; El nombre de los pacientes cuyas muestras de sangre han sido utilizadas solidariamente no será

almacenado en ningún registro ni revelado en ninguna publicación o presentación de los resultados del estudio. Se seguirán estrictamente las pautas éticas internacionales.

Resultados

La población evaluada incluyó 193 pacientes con las siguientes respuestas moleculares al momento del estudio: 12/193 (6%) RMNula, 17/193 (9%) RMMínima, 31/193 (16%) RMMenor, 57/193 (30%) RMMayor y 76/193 (39%) RMProfunda (incluye 33 RM4.0, 38 RM4.5 y 5 RM5.0). El porcentaje de casos con presencia de CD26+ fue disminuyendo a medida que aumenta la profundidad de la RM (Tabla 1). En la Figura 1 (1A, 1B, 1C) se observan los distintos histogramas correspondientes a pacientes con *stem cell* hematopoyética normal (SCH) (1A) y *stem cell* leucémica (SCL) (1B y 1C).

Cuando se analizó el porcentaje de la SCL CD26+ en la población CD34+/CD38- en las diferentes RM alcanzadas (Figura 2), no se encontraron diferencias significativas, excepto con la RMNula, la cual difería estadísticamente de las restantes respuestas moleculares [Kruskal Wallis: $p < 0,05$ vs RMMenor, $p < 0,01$ vs RMMayor, $p < 0,01$ vs RM4.0, $p < 0,0007$ vs RM4.5 y $p < 0,0007$ vs RM5.0].

Por lo tanto las diferentes RM se dividieron en dos grupos: pacientes con muy buena RM (≥ 3 log de reducción de los transcritos *BCR-ABL1*) incluyendo la RM-Mayor, RM4.0, RM4.5, RM5.0 y los que tenían mala RM (< 3 log) conteniendo RMNula, RMMínima y RMMenor. La evaluación estadística mostró diferencias significativas entre ambos grupos [Fisher: $P < 0.0003$, OR: 3,47 (CI: 1,76-6,82)] (Tabla 2, Figura 3).

Se pudo constatar que a mayor profundidad de RM, disminuye el porcentaje de casos con CD26+.

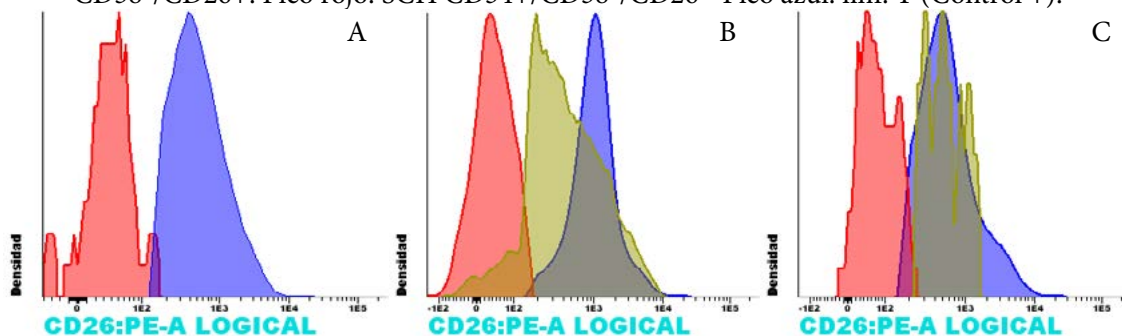
Tabla 1. Proporción de casos CD26+ y CD26- teniendo en cuenta la Respuesta Molecular

Respuesta molecular (RM)	Casos SCL*	CD26+	Casos SCH#	CD26-	Total
	n	%	n	%	n
RM nula	10	83,3	2	16,7	12
RM mínima	7	41,2	10	58,8	17
RM menor	9	29	22	71	31
RM mayor	12	21	45	79	57
RM 4.0	7	21	26	79	33
RM 4.5	5	13	33	87	38
RM 5.0	-	-	5	100	5
Total	50	26	143	74	193

*SCL CD26+: Stem Cell leucémica CD26+

#SCH CD26- : Stem Cell Hematopoyetica normal CD26-

Figura 1. Inmunofenotipo de *stem cell* hematopoyética normal (SCH) y *stem cell* leucémica (SCL). A. Paciente con ausencia de SCL. Pico rojo: SCH CD34+/CD38-/ CD26-. Pico azul: linf. T (Control +). B. Paciente con presencia de SCL. Pico amarillo: SCL CD34+/CD38-/CD26+. Pico rojo: SCH CD34+/CD38-/CD26-. Pico azul: linf. T (Control +). C. Paciente con presencia de SCL. Pico amarillo: SCL CD34+/CD38-/CD26+. Pico rojo: SCH CD34+/CD38-/CD26- Pico azul: linf. T (Control +).



Cuando se analizaron exclusivamente los 76 pacientes con RMP se observó que el porcentaje de casos con persistencia de SCL CD26+ fue de 21%, 13% y 0% en RM4.0, RM4.5 y RM5.0 respectivamente (Tabla 3 y Figura 4).

Si bien estos datos no muestran diferencias estadísticamente significativas, se observa un aumento de

la SCH normal CD26(-) a medida que aumenta la profundidad de la respuesta molecular.

Discusión

La cuantificación de los transcritos *BCR-ABL1* por qRT-PCR constituyen el *gold standard* para el monitoreo de la enfermedad mínima residual con alta

Figura 2. Porcentaje de Stem Cell Leucemica (SCL CD26+) en las diferentes Respuestas Moleculares respecto de la RM Nula. Kruskal Wallis: *p<0,05; **p<0,01; ***p< 0,0007 vs RM Nula

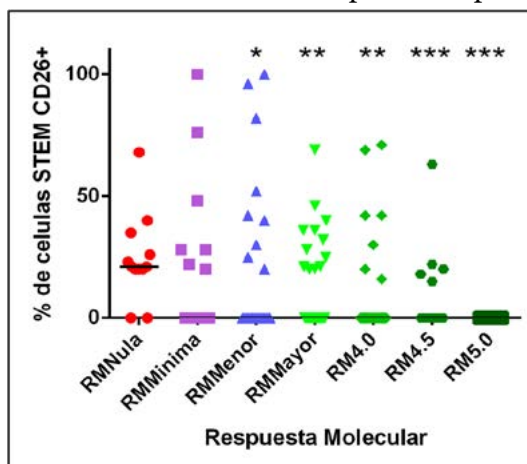
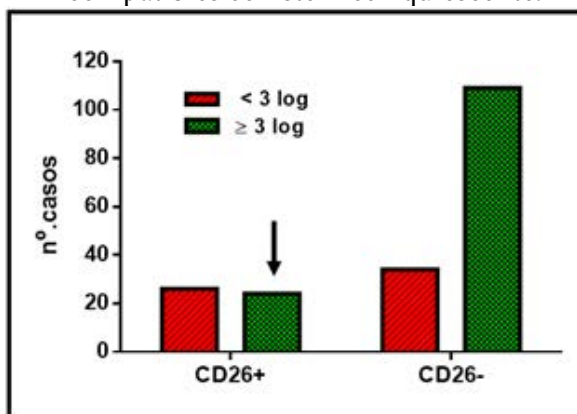


Tabla 2. Distribución de la stem cell CD26+ y stem cell CD26- respecto a la Respuesta Molecular (<3log o ≥3log)

SCL	Reducción < 3 log	Reducción ≥ 3 log	Total
CD26 (+)	26	24	50
CD26 (-)	34	109	143
Total	60	133	193

p<0.0003, OR: 3.47 (CI: 1,76 - 6,82)

Figura 3. Stem Cell CD26+ / CD26- y respuesta molecular. p<0.0003, OR: 3.47 (CI: 1,76 - 6,82). La flecha indica los casos con respuesta molecular (≥ 3log) y presencia de SCL CD26+, compatibles con stem cell quiescente.



sensibilidad^(14,15,16). Sin embargo, este método es incapaz de detectar células neoplásicas que estén en un estado quiescente, no replicativo. Por lo tanto es importante incluir otros estudios que permitan caracterizar la SCL independientemente de su estado proliferativo, dado que la misma puede presentar largos periodos de latencia⁽¹⁷⁾ dependiendo de la respuesta al tratamiento. La detección de la SCL analizando el inmunofenotipo permite investigar su persistencia a pesar de la ausencia de transcritos *BCR-ABL1*⁽¹⁸⁾.

Recientes trabajos de citometría de flujo investigando el inmunofenotipo de la SCL en LMC han permitido discriminarla de la SCH normal^(8,10,19). De esta manera se logró determinar que el perfil CD45+/CD34+/CD38-/CD26+ es característico de la SCL en LMC y está ausente en médula ósea normal o leucemias mieloides/linfoides agudas^(8,9). Adicionalmente, al separar por *cell sorting* poblaciones de SCL CD26+ y CD26- se pudo demostrar, aplicando la técnica de hibridación in situ (FISH) y qRT-PCR, que solamente las SCL CD26+ presentaban el rearrreglo molecular *BCR-ABL1*⁽⁸⁾.

Teniendo en cuenta esta información, en este trabajo se evaluó en la misma muestra de sangre periférica la SCL

por citometría de flujo y la cuantificación de los transcritos *BCR-ABL1* por qRT-PCR en pacientes con LMC en diferentes estadios de la evolución de la enfermedad a fin de investigar si en los casos con respuestas moleculares profundas persistía la SCL CD26+.

Nuestros resultados muestran que los pacientes con buena RM ($\geq 3\log$) se asocian significativamente a una menor proporción de casos con presencia de SCL. Cuando el análisis de SCL se realizó exclusivamente en casos con RMP, se observó una disminución de la misma a medida que aumentaba la profundidad de la respuesta molecular. Dado que la SCL puede persistir como una célula quiescente, no replicativa, podría permanecer incluso en casos con RM indetectable. En nuestro estudio la persistencia de SCL en los casos con RMP fue del 16%, indicando que estas células perduran a pesar de la RM lograda. Este nuevo enfoque podría ser útil durante el seguimiento de la enfermedad y análisis de la recurrencia molecular luego de la discontinuación del tratamiento. Estudios prospectivos permitirán definir las implicancias clínicas de la investigación de la persistencia de la SCL a pesar de la ausencia de transcritos *BCR-ABL1*.

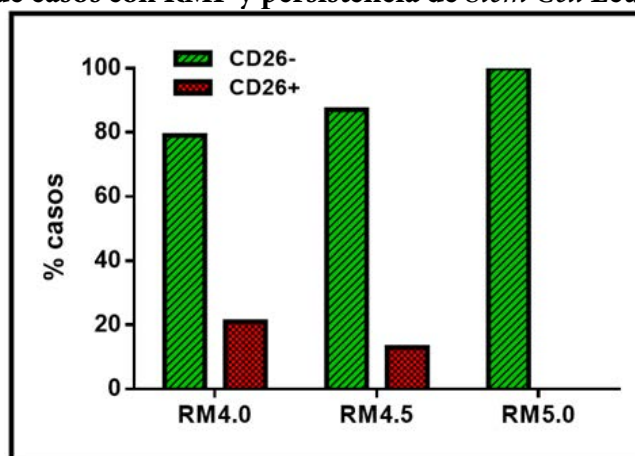
Tabla 3. SCL CD26+ Respuesta Molecular Profunda (RM 4.0, RM 4.5, RM 5.0)

RM	SCH* CD26-	SCL# CD26+	Total casos
RM 4.0	26 (79%)	7 (21%)	33
RM 4.5	33 (87%)	5 (13%)	38
RM 5.0	5 (100%)	0 (0%)	5
			p=NS

*SCL CD26+: Stem Cell leucémica CD26+

#SCH CD26- : Stem Cell Hematopoyetica normal CD26-

Figura 4. Porcentaje de casos con RMP y persistencia de Stem Cell Leucémica CD26+ (p=NS)



Conflictos de interés: Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243: 290-293.
2. Melo J, Barnes D. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:441-453.
3. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344:1031-1037.
4. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122:872-84.
5. Mahon F, Rea D, Guihot J et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years. The prospective multicenter Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:1029-1035.
6. Etienne G, Guilhot J, Rea D et al. Long-Term follow up of the french stop imatinib (STIM1) study in patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncology*. 2017;35:298-305.
7. Cheloni G, Poteti M, Bono S et al. The leukemic stem cell niche: adaptation to "Hypoxia" versus. *Oncogene Addiction*. *Stem Cell Int*. 2017:4979474.
8. Herrmann H, Sadovnik I, Cerny-Reiterer S et al. Depeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cell (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2014;123:3951-3962.
9. Valent P, Sadovnik I, Racil A et al. DPPIV (CD26) as a novel stem cell marker in Ph+ chronic myeloid leukemia. *Europ J Clinical Investigations*. 2014;44:1239-1245.
10. Raspadori D, Pacelli P, Sicuranza A et al. Flow cytometry assesment of CD26+ leukemic stem cells in peripheral blood: A single and rapid new diagnostic tool for chronic myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019;96(4):294-299.
11. Peled A, Hardam I, Trakhtembrot L et al. Immature leukemic CD34-CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF/1. *Stem Cells*. 2002;20(3):259-266.
12. Floriam S, Someneck K, Hauswirth AW et al. Detection of molecular target on the surface of CD34+/CD38- stem cells in various myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2006;47:207-222.
13. Hochhaus A, Baccarani M, Silver R et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966-984.
14. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108:28-37.
15. Cross NC, White HE, Muller MC et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012; 6:2172-2175.
16. Cross NC, White HE, Colomer D et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29:999-1003.
17. Chomel JC, Turhan AG. Chonic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Oncotarget*. 2011;2:713-727.
18. Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood*. 2012;119:1501-1510.
19. Culen M, Borsky M, Nemethova V et al. Quantitative assessment of the CD26+ leukemic stem compartment in chronic myeloid leukemia: patient - subgroups, prognostic impact, and technical aspects. *Oncotarget*. 2016;7 (22):33016-33024.



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.