

DÉBORA DOS SANTOS COSTA

**Estudo da frequência do fenótipo mutador para resistência aos antibióticos
beta-lactâmicos em linhagens de *E. coli* patogênicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia
Café Ferreira

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

SANTOS, D. C. **Estudo da frequência do fenótipo mutador para resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em linhagens de *E. coli* patogênicas**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Atualmente a alta incidência de isolados multirresistentes a antibióticos utilizados na clínica tem-se tornado alarmante. Estudos recentes demonstraram que um dos motivos que contribuem para o aumento da resistência a antibióticos em bactérias é a ocorrência de cepas que apresentam o fenótipo mutador. Deficiências nos genes do complexo *mut*, que incluem os sistemas de reparo dependente de metilação (MMR do inglês *methyl-directed mismatch repair*), e o sistema de reparo oxidativo (GO) podem gerar linhagens com um fenótipo mutador, que, por sua vez, levam ao aumento das taxas mutacionais espontâneas. Isolados clínicos com fenótipo mutador foram descritos em amostras de *Escherichia coli* patogênica empregando-se a resistência para antibióticos como rifampicina, cloranfenicol e quinolonas mas não há registros de estudos envolvendo o possível impacto do fenótipo mutador sobre a frequência de mutações espontâneas que levem à resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. No presente trabalho estudamos a ocorrência do fenótipo mutador frente à resistência aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo uso clínico em cepas de *E. coli* patogênicas de origem humana, incluindo 48 amostras de *E. coli* uropatogênica (UPEC) e 5 amostras de *E. coli* associadas a infecções entéricas. Foram utilizadas como controles positivos para o fenótipo mutador linhagens de *E. coli* K12 deficientes nos genes *mutY* ou *mutS*. Testes qualitativos revelaram a ocorrência de 6 amostras de UPEC e 2 amostras de EHEC com fenótipo mutador para cefalotina, ceftazidima e rifampicina. Entre as amostras estudadas, 3 linhagens de UPEC (amostras 29, 32 e 47) e 1 linhagem de EHEC (amostra 80) apresentaram fenótipo mutador frente à cefalotina e à ceftazidima confirmado em testes quantitativos com valores de mutação espontânea variando entre $0,68 \times 10^{-4}$ e $0,8 \times 10^{-6}$. Os resultados baseados em amplificação por PCR revelaram ausência de alterações estruturais em 3 genes do complexo *mut* (*mutS*, *mutY* e *mutL*) nos quatro isolados que apresentaram fenótipo mutador. O trabalho também envolveu a determinação dos níveis de resistência em clones derivados das 4 linhagens mutadoras após exposição à cefalotina ou à ceftazidima. As colônias obtidas também foram analisadas para a determinação da natureza de mutação que resultou na resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Os resultados obtidos apontam para aumento nos níveis de expressão de uma beta-lactamase para os derivados resistentes da amostra 32, possíveis alterações de permeabilidade do envoltório celular, e, indiretamente, modificação dos alvos celulares para esses antibióticos. Esses resultados revelam a elevada ocorrência do fenótipo mutador entre amostras de UPEC oriundas da clínica e destacam a importância do fenômeno sobre a ocorrência de resistência aos beta-lactâmicos de uso clínico.

Palavras-chave: Fenótipo mutador. Beta-lactâmicos. Genes *mut*. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

SANTOS, D. C. **Study of the mutator phenotype frequency to beta-lactam resistance in pathogenic *E. coli* strains.** 2012. 75 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Currently the high incidence of isolates with multiple resistance to antibiotics used in the clinic is alarming. Recent studies show that one of the reasons that may contribute to increased resistance in bacteria is the occurrence of strains with the mutator phenotype. Deficiencies in *mut* genes complex including methylation-dependent repair system (MMR from English *methyl-directed mismatch repair*) and oxidative repair system (GO) can generate strains with a mutator phenotype, which in turn leads to increasing spontaneous mutation rates. Clinical isolates with the mutator phenotype were reported among pathogenic *Escherichia coli* with antibiotics such as rifampicin, chloramphenicol and quinolones. Nonetheless, there are no studies describing the involvement of the possible impact of the mutator phenotype on the frequency of spontaneous mutations leading to resistance to beta-lactam antibiotics. In this work we studied the occurrence of the mutator phenotype leading to resistance to beta-lactam antibiotics use in clinics. For this purpose we tested a set of pathogenic *E. coli* strains of human origin, including 48 strains of uropathogenic *E. coli* (UPEC) and 5 strains of *E. coli* associated with enteric infections. As positive controls for the mutator phenotype we used *E. coli* K12 strains deficient in *mutY* or *mutS* genes. Qualitative tests revealed 6 UPEC samples and 2 EHEC strains with mutator phenotype for cephalothin, ceftazidime and rifampicin. Three UPEC strains (samples 29, 32 and 47) and one EHEC strain (sample 80) showed spontaneous mutation frequencies ranging from 0.68×10^{-4} to 0.8×10^{-6} to cephalothin and ceftazidime. The results based on PCR amplification revealed no structural changes in the *mut* gene complex (*mutS*, *mutY* and *mutL*) in the four mutator strains. The work also involved determination of the resistance level to cephalothin or ceftazidime of clones derived from the mutator strains. The colonies obtained were also analyzed to determine the nature of mutation leading to beta-lactam resistance. The results indicated increased expression levels of a beta-lactamase in derivatives of the 32 strain, possible reduction in cell envelope permeability and, indirectly, modification of cellular targets for these antibiotics. These results showed the high occurrence of mutator phenotype among UPEC strains derived from clinical settings and highlight the importance of the phenomenon on the occurrence of resistance to beta-lactam antibiotics in clinical use.

Keywords: Mutator phenotype. Beta-lactam. Genes *mut*. *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma eubactéria comumente encontrada como parte integrante da microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo humanos, e é classificada como um bastonete reto, gram-negativo, não formador de esporo, podendo ser móvel, quando da presença de flagelo, ou imóvel. As bactérias dessa espécie são anaeróbias facultativas e utilizam D-glicose e outros carboidratos com a formação de ácido e gás. As cepas de *E. coli* podem ser divididas em saprófitos (componentes da microbiota) que, na presença de alteração na imunidade do hospedeiro ou em uma mudança no microambiente que colonizam podem agir como patógenos oportunistas e as cepas patogênicas especializadas, com a capacidade de causar doenças intestinais ou extra - intestinais (TRAVIS et al., 2008).

A classificação tradicional de amostras de *E. coli*, baseia-se na determinação de antígenos somáticos (O), polissacarídeos capsulares (K) e flagelares (H), permitindo a diferenciação entre amostras patogênicas das comensais. O lipopolissacarídeo (LPS) também conhecido como endotoxina, é um componente essencial e característico da membrana externa das bactérias gram negativas, responsável por diversos efeitos biológicos, incluindo a inflamação e a resistência ao soro (KONEMAN, 2008).

1.1.1 *Escherichia coli* patogênica

As linhagens patogênicas de *E. coli* são classificadas da seguinte em linhagens enteropatogênicas, que causam danos intestinais ao hospedeiro, como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEG), *E. coli* enteroinvasiva A (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DEAC) e linhagens patogênicas extra-intestinais que são: *E. coli* causadora da meningite neo-natal e *E. coli* uropatogênica (UPEC) (KONEMAN, 2008).

A EPEC causa uma lesão histopatológica denominada “*attaching effacing*”, sendo que os enterócitos são degenerados e ocorre inflamação na lâmina própria, principalmente no íleo. Os fatores de patogenicidade são codificados por uma ilha de patogenicidade denominada *locus enterocyte effacement* (LEE). A região LEE codifica importantes fatores para a aderência, como a intimina bem como uma série de proteínas denominadas EspS (EPEC secreted proteins) (CLEARY, 2004).

EHEC caracteriza-se pela produção de hemolisina e produção da toxina *shiga like* (SLT) codificada pelo gene *stx1* ou *stx2*. A citotoxina Shiga é prejudicial para uma variedade de células endoteliais, incluindo células do cólon e íleo em humanos. A STx 1, toxina de Shiga em *E. coli*, é idêntica a Shiga toxina de *Shigella dysenteriae*, e por isso recebe esse nome. Linhagens de *E. coli* que produzem a toxina de Shiga também podem ser classificadas como *E. coli* Shiga Toxigênicas (STEC) ou *E. coli* verotoxigênicas (VTEC) (DOUGAN et al., 2001). Em humanos, a infecção por EHEC pode ocasionar a síndrome hemolítica urêmica, podendo apresentar uma alta taxa de mortalidade. Essa doença ocorre quando as toxinas produzidas por *E. coli* são absorvidas pela circulação sistêmica e caracteriza-se por trombocitopenia, anemia hemolítica e nefropatia. O sorotipo O157:H7 é um dos mais identificados e conhecidos dentre as estirpes de EHEC (HENTON et al., 1994).

Linhagens caracterizadas como EIEC apresentam características bioquímicas, genéticas e de patogenicidade semelhantes a *Shigella sp.* Os mecanismos de patogenicidade deste patotipo não estão completamente elucidados, contudo estudos demonstram que o microrganismo invade profundamente o epitélio do intestino, e em seguida, atinge o sistema linfático, onde se multiplica ao mesmo tempo em que ocorre a morte de algumas células e produção de endotoxinas. O quadro clínico caracteriza-se por uma forte reação inflamatória, presença de úlceras, diarreia aquosa podendo apresentar muco e sangue (HENTON et al., 1994).

As linhagens de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) são enterovirulentas e produzem toxinas de efeito rápido provocando a doença de gastroenterite. Dentre os fatores de virulência encontrados em ETEC, podemos destacar as exotoxinas termoestáveis (STa e STb) e termolábil (LT), uma toxina conhecida como EAST e produção de fímbrias para adesão à mucosa do intestino (SIXMA, 1993).

Dentre as *E. coli* patogênicas extra-intestinais, as UPECs estão envolvidas em aproximadamente 80% dos casos de infecções do trato urinário (ITU). A urina é um excelente meio de cultura para a maioria dos microrganismos que infectam o trato urinário e o crescimento bacteriano pode ocorrer resultando em contagens elevadas em infecções estabelecidas não tratadas, ou mesmo por contaminação da genitália externa (CAMARGO, 2001).

1.1.2 *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)

A grande variabilidade genética encontrada entre as cepas de UPEC não permite que as mesmas sejam agrupadas em categorias distintas como acontece no caso de *E. coli* diarreio gênicas. Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar a origem dessa diversidade. Uma delas preconiza que bactérias patogênicas podem se transformar em bactérias uropatogênicas através da transmissão horizontal de genes de virulência que possibilitam que as mesmas infectem e sobrevivam no trato urinário (ABE, 2008). Através dos fatores de virulência, algumas cepas de UPEC podem invadir as células epiteliais do hospedeiro e produzir um biofilme intracelular que confere proteção em relação ao ataque do sistema imune e tratamento com antibióticos por longos períodos. Essa propriedade das UPECs pode explicar a natureza enigmática da infecção crônica e recorrente da ITU (ANDERSON et al., 2004).

Os fatores de virulência mais comumente associados às UPECs são: (i) adesinas específicas, como fimbria P (Pap), fimbria tipo 1, fimbria S; (ii) outras adesinas não fimbriais; (iii) hemolisina e (iv) formação de cápsula de polissacarídeos para imunoevasão (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). Destaca-se a fimbria tipo 1 por ser um importante fator de virulência encontrado em UPEC e em outras *Enterobacteriaceae*. Ela possui afinidade a oligossacarídeos do tipo manose e em UPEC é essencial para a adesão ao epitélio do trato urinário (BOWER et al., 2005).

1.2 Infecções urinárias e antibioticoterapia

O trato urinário é usualmente um ambiente estéril, excetuando – se a uretra distal que apresenta organismos residentes. A manutenção deste ambiente ocorre devido a presença de uma série de mecanismos que atuam na prevenção das ITU. A alta osmolaridade, baixo pH, presença de ácidos orgânicos e concentração de ureia, além do fluxo e produção constantes, os quais possibilitam a eliminação mecânica de microrganismos, são alguns deles. Devem ser consideradas ainda as barreiras de defesa das mucosas e a imunocompetência sistêmica do hospedeiro.

A infecção do trato urinário (ITU) caracteriza-se pela presença de agentes infecciosos e invasão tissular em qualquer parte do trato urinário (urina, bexiga, rins), sendo usualmente classificada de acordo com o seu sítio de infecção. A infecção do trato urinário pode ser assintomática ou sintomática, e um quadro muito comum no trato urinário é a bacteremia

assintomática, que é definida mais precisamente como o isolamento de bactérias na urina em quantidade maior ou igual a 10^5 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml), mas sem sintoma local ou sistêmico de infecção (STAMM, 2002). A bacteremia de baixa contagem pode significar contaminação, contudo, a maioria dos microorganismos isolados é típica de infecção do trato urinário, como a *E. coli* dentre outras enterobactérias gram negativas ou *S. saprophyticus*. Portanto, a baixa contagem de bactérias pode refletir uma fase inicial de ITU, uma diluição urinária por maior ingestão de líquidos, crescimento lento de certos uropatógenos ou ainda síndrome uretral (STAMM, 2002). As ITU são classificadas como: inferior (cistite-infecção na bexiga) e superior (pielonefrite - infecção do rim). Os sintomas da cistite são relativamente moderados, já a pielonefrite apresenta sintomas mais graves e em 30% dos casos pode gerar complicações, onde uma bacteremia pode evoluir para um quadro de sepse. (ANDERSON et al., 2004). As ITU representam o principal tipo de infecção hospitalar e é uma das mais frequentes causas de consultas na prática médica, com cerca de 40% do total das infecções adquiridas em hospitais e, em custo, 14% do valor total despendido com as infecções nosocomiais. A grande maioria das ITU é causada por enterobactérias, mas também podem ser provocadas por outros microorganismos, *E. coli* permanece o uropatógeno predominantemente isolado de infecções agudas (VIEIRA et al., 2007; ARSLAN, 2005).

A antibioticoterapia em casos de infecção urinária é realizada através do uso de diferentes agentes antimicrobianos. Os antibióticos mais utilizados no tratamento de ITU são os seguintes: sulfametoxazol, trimetropim, amoxicilina, ácido nalidixico, cefalexina, ciprofloxacina, norfloxacina e nitrofurantoína (HEILBERG; SCHOR, 2003). Na rotina de microbiologia clínica, além dos antibióticos citados acima, são testados cefalosporinas de todas as classes (cefalotina, ceftazidima, cefoxitina, cefepime), gentamicina, amicacina, imipenem, meropenem, além do monobactâmico aztreonam.

No que diz respeito ao modo de ação e mecanismos de resistência dos agentes antimicrobianos destacam-se algumas classes, como: aminoglicosídeos, os componentes dessa classe atuam diretamente no ribossomo bacteriano, se ligam à porção 30S do ribossomo, diminuindo a síntese protéica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro. Os mecanismos de resistência contra aminoglicosídeos são: redução da concentração no interior da célula através da ação de bombas de efluxo, alteração do alvo e inativação de enzimas (acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferase) (KONEMAN, 2008). As quinolonas são utilizadas para o tratamento de infecções respiratórias e urinárias. O alvo das quinolonas são as topoisomerases tipo II (DNA-girase em gram-negativas), enzimas que

separam as fitas de DNA em duas fitas simples. Mutações nos genes que codificam a DNA girase é o principal mecanismo de resistência contra essa classe de antibióticos. O cloranfenicol é um antibacteriano de largo espectro, utilizado principalmente contra bactérias anaeróbias, mas utilizado como controle em todos gram-negativos por ser considerado um antibiótico potencialmente indutor de resistência. Tem ação sobre a síntese proteica, inibindo a formação das ligações peptídicas durante o alongamento da cadeia polipeptídica. O principal mecanismo de resistência bacteriana que inativa esse agente é a enzima cloranfenicol acetiltransferase (TENOVER, 2006). A rifampicina não é usualmente utilizada contra gram-negativos porém é utilizado como controle positivo em cepas mutadoras, que frente a esse antibiótico apresentam o fenótipo mutador com grande quantidade de colônias satélite. A presença de colônias heteroresistentes em relação a rifampicina ocorre devido a mutações no gene *rpoB*, que promove o aumento da resistência. A Rifampicina tem sua ação sobre a RNA-polimerase, promovendo uma ligação irreversível e bloqueando a iniciação da cadeia de RNA. Os beta-lactâmicos incluem as penicilinas (ampicilina), penicilina + inibidor de beta-lactamase (piperacilina/tazobactam), cefalosporinas de primeira (cefalexina, cefalotina), segunda (cefotaxima), terceira (ceftazidima, ceftriaxona) e quarta geração (cefepime), monobactâmicos (aztreonam), carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem). Essa categoria de antibióticos possui larga aplicação clínica e os mecanismos de resistência a esses compostos podem envolver diferentes estratégias, como descrito no próximo item (TENOVER, 2006)

1.3 Antibióticos beta-lactâmicos

Atualmente, os antibióticos beta-lactâmicos permanecem como componentes essenciais a antibioticoterapia utilizada para o tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativo em hospitais (CLSI, 2011). As cefalosporinas são agrupadas em “gerações” por suas características antimicrobianas. As primeiras cefalosporinas foram agrupadas na “primeira geração” enquanto mais adiante, cefalosporinas de espectro de ação mais amplo frente a bactérias gram-negativas, foram classificadas como cefalosporinas de segunda geração. Cada nova geração de cefalosporinas tem mais potência frente a bactérias gram-negativas e características antimicrobianas perceptivelmente maiores que a geração precedente. Os carbapenêmicos também são um grupo de antibióticos beta-lactâmicos com a diferença de que o átomo de enxofre no anel tiazolidínico da molécula de penicilina é substituído por um átomo de carbono (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A obtenção do ácido 6-amino-penicilânico por hidrólise da penicilina, permitiu a síntese de diversos beta-lactâmicos por adição e/ou substituição de radicais, como a ampicilina e a ureidopenicilina. A primeira cefalosporina foi isolada de *Cefasloporium acremonium* em 1948, mas apenas após a caracterização do ácido cefalosporânico e modificações em suas cadeias laterais, teve seu uso clínico iniciado em 1964. As cefalosporinas, junto com as cefamicinas, constituem o subgrupo dos cefens. Possuem em sua estrutura básica o anel beta-lactâmico associado a um anel dihidrotiazinico, denominados em conjunto, ácido cefalosporânico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Os antibióticos beta-lactâmicos, atuam na parede celular bacteriana que é composta por unidades alternadas de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG), cuja ligação covalente é catalisada por transglicosidades. A ligação entre as cadeias com repetições de NAM e NAG é feita entre os terminais pentapeptídico com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. A ligação entre as cadeias com repetições NAM e NAG é feita entre os terminais pentapeptídicos das moléculas de NAM, cada NAM possui um terminal pentapeptídico com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. A ligação covalente entre esses dois resíduos – a transpeptidação- é catalisada pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Essas ligações, que se repetem ao longo de toda a parede celular, são essenciais para conferir à mesma rigidez e estabilidade. Os antibióticos beta-lactâmicos atuam interferindo na biosíntese da camada de peptidoglicano, o anel beta-lactâmico tem estrutura semelhante ao terminal D-alanina-D-alanina do NAM, o que permite a sua ligação às PBPs, que por sua vez sofrem acilação durante essa interação, o que as torna incapazes de catalisar outras reações de transpeptidação (DRAWZ SM, 2010). Como a parede celular é uma estrutura dinâmica e duplicada a cada 20 ou 30 minutos, para a divisão bacteriana, e a primeira etapa da síntese da parede inclui a autólise para inserção de novas unidades de NAM e NAG, a parada da síntese causada pelo beta-lactâmico resulta indiretamente na desestruturação da parede e predispõe a célula à lise osmótica. Além das transpeptidases, outras proteínas ligadoras de penicilina participam da formação da parede da célula bacteriana e possuem funções distintas. Dessa forma a interferência com diferentes PBPs produz diferentes efeitos morfológicos à medida que a síntese da parede é comprometida (KONEMAN, 2008). As cefalosporinas são amplamente utilizadas no tratamento de ITU causada por bactérias da família *Enterobacteriaceae* e mostra grande afinidade pela PBP3 em *E. coli*, a qual, quando inativa resulta na inibição da divisão celular.

Sobre os mecanismos de resistência dessa categoria, esses podem ser expressos continuamente haja ou não um estímulo (KONEMAN et al., 2008). Essa assertiva é referida

como expressão constitutiva. Em contrapartida, alguns genes precisam ser “induzidos” pela exposição à substância estimulante antes de produzirem o produto do gene induzido. Muitas beta-lactamases das bactérias gram-negativas estão presentes no cromossomo e são produzidas constitutivamente, mas podem ser induzidas para produzir níveis ainda maiores da enzima. Alguns mecanismos são expressos de forma homogênea (totalidade da população bacteriana testada), enquanto outros são expressos de forma heterogênea (apenas uma pequena fração das bactérias) (KONEMAN, 2008).

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, geralmente é impulsionada pela produção de enzimas beta-lactamases codificadas por plasmídeos (mecanismo de resistência exógena), porém outros mecanismos de resistência codificados pelo cromossomo (mecanismos de resistência endógena) também podem ser utilizados pela bactéria contra os beta-lactâmicos, como a alteração na permeabilidade, alteração da proteína alvo (PBPs) impedindo a ligação do antibiótico, ou ainda, pela conjugação desses mecanismos (MOYA et al., 2009).

1.4 Mecanismos de resistência

1.4.1 Produção de enzimas beta-lactamases

Compostos beta-lactâmicos são produzidos por diversos microorganismos presentes no solo e provavelmente sua produção pode representar uma vantagem competitiva pelo nicho ecológico. De modo análogo, a produção de beta-lactamases pode representar uma vantagem adaptativa para garantir a integridade da parede celular. As beta-lactamases constituem um grupo diverso de enzimas, mas tem em comum a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico. Inicialmente as beta-lactamases acilam os beta-lactâmicos e a seguir atuam hidrolisando-os, o que permite a regeneração de sua capacidade catalítica, tornando-as disponíveis para atuar em outra catálise (DRAWZ, 2010). Muitos gêneros de bactérias gram-negativas apresentam ocorrência natural de beta-lactamases mediadas por cromossomos. Essas enzimas são estruturalmente relacionadas com as PBPs e apresentam homologia em sua sequência (GHUYSEN, 1991).

Duas classificações de beta-lactamases são amplamente utilizadas. A primeira proposta foi a de Ambler, que se baseia na similaridade de sequências de aminoácidos, sendo as enzimas agrupadas em quatro classes principais A, B, C e D, nessa classificação, o grupo de enzimas com capacidade de hidrolisar oximiino cefalosporinas denominado beta-

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

