

El Método MODS, una Alternativa para el Diagnóstico de la Tuberculosis y la Detección de Cepas Multidrogoresistentes

The MODS Method, an Alternative for the Diagnosis of Tuberculosis and the Detection of Multidrug-Resistance Strains

Rodrigo Arturo Arnez-Durán¹, Luis Alberto Ayllón-Anzaldo¹, Rosario Castro-Soto², Daniel Lozano-Beltrán³

RESUMEN

En reiteradas ocasiones se ha establecido la necesidad de contar con un método rápido, sensible, específico y de bajo costo que permita realizar un diagnóstico oportuno de la Tuberculosis y la detección temprana de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogaresistentes. Respondiendo a esta necesidad se ha diseñado un método capaz de distinguir entre pacientes con Tuberculosis y pacientes control sanos, además de facilitar la detección de cepas resistentes a los fármacos isoniazida y rifampicina de manera más rápida y efectiva en comparación con las pruebas consideradas como *Gold Standard*.

En esta revisión analizaremos el método de Susceptibilidad a Fármacos mediante Observación Microscópica (MODS).

ABSTRACT

Has been repeatedly highlighted the need for a rapid, sensitive, specific and low-cost method that allows early diagnosis of Tuberculosis and multidrug-resistance strains. Responding to this need, a method has been designed, which is able to distinguish between patients with Tuberculosis and healthy control patients, also facilitate the detection of drug-resistance strains to the drugs isoniazid and rifampin for faster and more effective way compared to the tests considered as Gold Standard.

In this review we discuss the method Microscopic-Observation Drug Susceptibility (MODS).

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa que se extiende a través del aire; si no se trata, una persona que presente TB activa infecta alrededor de 10 a 15 individuos cada año. Más de 2 billones de personas, cifra equivalente a un tercio de la población mundial, está infectada con el *Mycobacterium tuberculosis*; 1 de cada 10 personas infectadas sufrirá la enfermedad activa en su vida¹. Actualmente se estima que 1,3 millones de personas mueren a causa de TB cada año y que existen aproximadamente 0,5 millones de casos de MDR-TB en el mundo².

Esta enfermedad agobia desproporcionalmente a los países de bajos recursos económicos y constituye uno de los problemas de salud pública más serios en Bolivia, donde la falta de un diagnóstico temprano, incapacidad de determinar la susceptibilidad a drogas y el creciente número de casos de personas infectadas con el VIH^{3,4}, crean un efecto sinérgico con la pobreza. Las actuales estrategias de control pierden importantes oportunidades para interrumpir

la transmisión⁵. El cultivo convencional en medio de Löwenstein-Jensen sigue utilizándose para el diagnóstico; sin embargo, éste puede tomar varias semanas antes de tener un resultado concluyente^{5,6}.

Este método fue desarrollado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia por Luz Caviedes y Robert Gilman mientras trabajaban en indicadores de reducción colorimétrica. Cuando Caviedes examinaba cultivos en una placa de 24 pozos, empleando un microscopio óptico de luz invertida, pudo claramente identificar colonias de *M. tuberculosis* en el medio líquido mucho tiempo antes de que el crecimiento afectara las propiedades colorimétricas del mismo, Gilman reconoció de inmediato la potencial utilidad de este hallazgo para el desarrollo de un ensayo diagnóstico⁷.

Microscopic-Observation Drug Susceptibility Assay o MODS, nombre que deriva de sus siglas en inglés, las cuales significan Ensayo de Susceptibilidad a Fármacos mediante Observación Microscópica. Se basa en un cultivo en medio líquido que detecta *M. tuberculosis* y evalúa la susceptibilidad frente a los antimicro-

¹Estudiante de medicina, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia

²Servicio de infectología, Hospital Clínico Viedma. Cochabamba, Bolivia.

³CEADES salud y medio ambiente, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

Correspondencia a:

Rodrigo Arturo Arnez Durán
rockarnes@hotmail.com

Palabras claves: tuberculosis, diagnóstico, tuberculosis resistente a múltiples medicamentos

Keywords: tuberculosis, diagnosis, multidrug-resistant tuberculosis

Abreviaciones y acrónimos utilizados en este artículo:

TB = Tuberculosis
MDR-TB = Multidrug-Resistant Tuberculosis [Tuberculosis multi-drogo-resistente]
MODS = Microscopic Observation Drug Susceptibility [Susceptibilidad a Fármacos mediante Observación Microscópica]
UFC = Unidades formadoras de colonias

Procedencia y arbitraje: no comisionado, sometido a arbitraje externo.

Recibido para publicación:
30 de Septiembre de 2010
Aceptado para publicación:
30 de Noviembre de 2010

Citar como:
Rev Cient Cienc Med 2010;13(2):
81-5

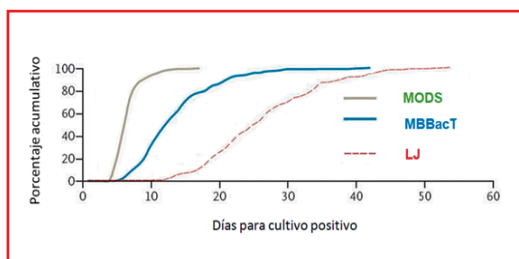


Figura 1: Porcentaje acumulativo para la positividad del cultivo⁵.

bacterianos de primera línea isoniácida y rifampicina directamente desde muestras de esputo⁸. Su empleo se sustenta en tres principios importantes: (1) *M. tuberculosis* crece más rápido en medio líquido que en medio sólido; (2) la posibilidad de la visualización de los cultivos (microcolonias) en forma de cordón en medio líquido bajo un microscopio invertido en una etapa temprana. Empleando un microscopio óptico de luz invertida y una placa de 24 pozos conteniendo muestras de esputo decontaminadas y resuspendidas en caldo Middlebrook 7H9 suplementado se puede examinar y detectar las microcolonias en un promedio de 7 días, y este es mucho más rápido que la detección del crecimiento macroscópico de las colonias en medio sólido; y (3) que la incorporación de las drogas isoniácida y rifampicina permite una rápida y directa detección de sensibilidad en forma concomitante con la observación del crecimiento bacteriano⁹.

Esta prueba está dirigida específicamente hacia el mundo en desarrollo, a fin de brindar alta especificidad y sensibilidad a un precio menor de 2 \$, con una metodología de relativa simplicidad, recientemente revisada en la cual se han desechado todas las redundancias de la metodología original¹⁰.

De modo que, el MODS constituye una técnica simple, que aunada a la alta sensibilidad del medio líquido frente al medio sólido para la detección de TB, la especificidad del crecimiento característico del *M. tuberculosis*, la evaluación de la susceptibilidad frente a drogas en un corto tiempo y el bajo costo de los reactivos, representan las mayores ventajas de este método frente a otras pruebas basadas en el cultivo que se utilizan actualmente para el diagnóstico de la TB.

Son puntos clave los siguientes: la sensibilidad (98%) supera significativamente a la del cultivo en medio Löwenstein-Jensen (84%) y al cultivo automatizado MBBacT (BacTAlert) (89%); resalta la rapidez de la detección (a partir del 7º día) comparada con Löwenstein-Jensen (26 días) y el MBBacT (13 días) (figura 1); a esto se añade que, el estudio de la susceptibilidad a fármacos se prolonga por varias semanas para los métodos mencionados, excepto para el MODS⁹. Es así como se reporta en un estudio rea-

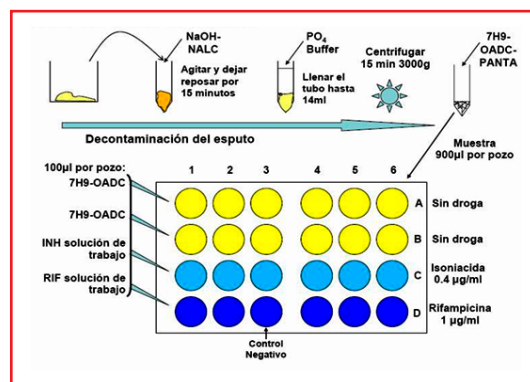


Figura 2: Placas de 24 pozos para el estudio de MODS¹³

lizado en Lima, Perú, desde Abril de 2003 hasta Julio de 2004, que incluyó 3760 muestras de esputo, de las cuales 401 (10,7%) fueron positivas para *M. tuberculosis*^{4,9}.

Los cultivos positivos son detectados hasta el día 21 y más del 98% de estos se observan durante las primeras 2 semanas. Se ha revelado una concordancia del 99% en relación a los métodos considerados como el *Gold Standard*⁹.

SOLUCIONES STOCK

Son soluciones requeridas para el empleo de MODS:

Medio líquido Middlebrook 7H9 con casitona y glicerol

Middlebrook y colegas desarrollaron la fórmula base del caldo 7H9 durante el mismo período en que diseñaron la base agar 7H10; ambos tipos de medios favorecen el crecimiento de las especies micobacterianas cuando son suplementadas con distintos nutrientes para su utilización en estudios de laboratorio^{11,12}.

El caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson®), en fórmula aproximada por litro de agua purificada, contiene: fosfato monopotásico 2 g, fosfato disódico 1,5 g, glutamato monosódico 0,5 g, citrato sódico 0,1 g, sulfato de amonio 0,5 g, piridoxina 0,001 g, citrato férrico de amonio 0,04 g, sulfato magnésico 0,05 g, sulfato de zinc 0,001 g, sulfato de cobre 0,001 g, biotina 0,5 g, cloruro de calcio 0,5 g.

OADC

Suplemento de enriquecimiento del medio compuesto por ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa: la preparación comercial viene lista para su uso^{4,13}.

PANTA

Suplemento antimicrobiano usado para minimizar la contaminación de los cultivos de MODS que puede ser causada por la flora oral de microorganismos no eliminados durante el proceso de decontaminación.

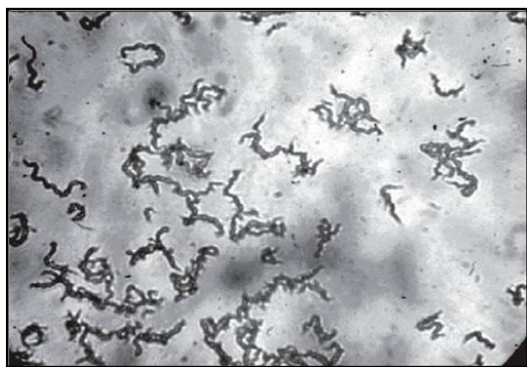


Figura 3: Aspecto de las microcolonias de *M. tuberculosis* en pozos de cultivo en medio líquido (objetivo 20x)⁹

Contiene una mezcla liofilizada de agentes antimicrobianos: Polimixina B, Amfotericina B, Ácido Nalidíxico, Trimetoprim, Azlicilina^{4,13}.

Soluciones Stock de antibióticos

Se emplean isoniácida 20 mg disuelta en 2,5 ml de agua destilada estéril y rifampicina 20 mg disuelta en 1,25 ml de dimetil sulfoxido y 1,25 ml de agua destilada estéril. Ambas soluciones se filtran y almacenan por separado en alícuotas de 20 µl en tubos estériles de microcentrífuga a -20°C hasta por 6 meses. Cada una de las alícuotas de 20 µl es suficiente para el estudio de 100 muestras (incluyendo sobrantes)¹³.

Soluciones para la recontaminación del esputo

Se emplean: hidróxido de sodio (NaOH), citrato de sodio tribásico dihidratado, fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄), fosfato de potasio monobásico en cristales (KH₂PO₄), N-acetil-L-cisteína (NALC), así como hipoclorito de sodio 10% para desinfectar el material contaminado¹³.

Cepas para el control positivo

Deben utilizarse cepas bien caracterizadas de *M. tuberculosis* (cepa H37Rv de *M. tuberculosis* ATCC 27294 para el control sensible y una cepa MDR) como controles positivos^{5,13}. Se coloca la solución de la cepa en una placa Petri conteniendo agar Middlebrook 7H11 y se emplean cada vez que las muestras clínicas se procesan para MODS utilizando solución estéril de Tween 80 al 10% y agua destilada estéril. Los controles positivos evalúan la calidad del medio y la efectividad de los antibióticos. Para disminuir el riesgo de contaminación cruzada, estos controles positivos son procesados y colocados en una placa diferente, este proceso se realiza después de que las muestras clínicas hayan sido procesadas y selladas en bolsas plásticas tipo ziplock^{10,13}. Se debe ajustar la turbidez a la escala 1 de McFarland, lo que involucra manipulación de concentradas suspensiones mico-

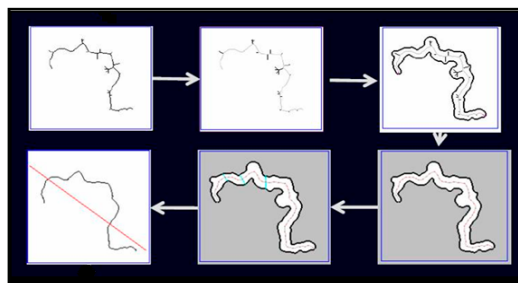


Figura 4: Crecimiento de *M. tuberculosis* en forma de curvas, comas o espirales¹⁵

bacterianas y deben llevarse a cabo solo en cabinas de bioseguridad¹³⁻¹⁶.

Si las cepas control no están comercialmente disponibles, se pueden emplear cepas locales caracterizadas y con un patrón de susceptibilidad conocido (cepa sensible a todas las drogas, y una cepa MDR o mono-resistente a rifampicina e isoniácida). Si se prefiere, una cepa MDR puede ser reemplazada por dos cepas monoresistentes: una cepa resistente a isoniácida/sensible a rifampicina y otra cepa resistente a rifampicina/sensible a isoniácida¹³.

MÉTODO MODS

Para realizar MODS de manera segura se requiere como mínimo un Nivel de Bioseguridad 2 a 314. Específicas medidas de bioseguridad son necesarias para trabajar en MODS, estas se dividen en dos categorías: infraestructura adecuada y buenas prácticas de laboratorio. La principal preocupación de la prueba se refiere a la bioseguridad, y destaca que su uso seguro requerirá un “laboratorio básico de tuberculosis”^{10,14}.

Las placas para el estudio MODS están constituidas por 24 pozos distribuidos en 4 filas (ABCD) y 6 columnas (1-6), las filas A y B no contienen antibióticos, la fila C contiene isoniácida y la fila D contiene rifampicina. Los 4 pozos de la columna 3 se reservan para el control negativo, contienen cepas de *M. tuberculosis* sensible a los antibióticos y la columna 6 contiene cepas MDR¹⁵ (figura 2).

Todas las muestras de esputo son digeridas y decontaminadas de otros microorganismos mediante el método Standard N-acetil-L-cisteína-NaOH-citrato de sodio¹⁶. Para la preparación final de la placa de MODS se emplea una pipeta multicanal, se llenan cuidadosamente 4 puntas con 100 µl del medio 7H9-OADC más la solución de trabajo de antibióticos, se añaden 100 µl a los pozos de la columna 1 y se repite el mismo procedimiento hasta que todas las columnas contengan 100 µl del medio 7H9-OADC o la solución de trabajo de antibióticos. Se dispensan 900 µl de la suspensión final de la muestra a cada uno de los

4 pozos de las 6 columnas en la placa de 24 pozos, con excepción de la columna³.

Se dispensan 900 µl del medio 7H9-OADC-PAN-TA sin muestra en los 4 pozos de la columna 3 de cada placa, para realizar el control negativo¹⁷. Cerrar la placa, colocarla en una bolsa tipo ziplock e incubar a 37°C.

LECTURA DE LAS PLACAS

Los resultados para la mayoría de las muestras procesadas por MODS son claramente positivas (muchas colonias) o claramente negativas (no hay crecimiento). La dificultad se presenta cuando el crecimiento de las colonias es mínimo, o si se presenta contaminación⁵.

Un resultado positivo es definido como el crecimiento de dos o más unidades formadoras de colonia (>2 UFC) en cada uno de los pozos sin droga (figura 3). Un resultado negativo es definido como la ausencia de crecimiento de unidades formadoras de colonias para el día 21 de lectura¹³.

Las placas se retiran de la incubadora y se observan en el microscopio de luz invertida con las bolsas selladas, las cuales no son abiertas. Se inicia examinando los pozos sin antibióticos (A y B) con el objetivo 10X en el día 5 de incubación. En sus inicios (días 5-9) el crecimiento de *M. tuberculosis* parece como pequeñas curvas, comas o espirales (figura 4). La formación de las colonias por lo general progresa a la formación de cordones y luego a un crecimiento irregular más enmarañado^{5,18}. Para las lecturas subsecuentes se utiliza el objetivo 4X a fin de examinar todo el contenido de cada pozo. Si crecen dos o más unidades formadoras de colonias (> 2 UFC) en cada uno de los pozos sin antibióticos, el resultado es determinado como cultivo positivo. Si los resultados son negativos en el día 5, se debe continuar con la lectura diaria de los pozos sin antibióticos (o interdiario de acuerdo con la carga de trabajo del laboratorio) hasta que 2 UFC sean observados en cada pozo^{5,13}. Cuando se observa un resultado positivo, se procede a realizar la lectura hasta el día 15, se debe continuar la lectura hasta el día 18 y luego el día 21; si para ese día el resultado continúa siendo negativo, el resultado final será determinado como cultivo negativo. Si solo se reporta crecimiento de 1 UFC en algún pozo sin droga, o en ambos, el resultado será “indeterminado”.

No se debería leer los pozos con droga si la lectura en los pozos sin droga es negativa o indeterminada. Si los pozos se contaminaran con bacterias u hongos, se debe re-decontaminar y reprocesar las alícuotas que se guardaron o pedir una nueva muestra, si la contaminación está presente los resultados no pueden ser interpretados¹³.

Los pozos que contengan antibióticos sólo deben examinarse cuando los pozos sin droga son positivos. Se define la resistencia como el crecimiento bacteriano de ≥ 2 UFC en los pozos con drogas el mismo día en que ambos pozos sin drogas son positivos. En los raros casos en que se presente el crecimiento de 1 UFC el resultado es indeterminado. Se define la sensibilidad al antibiótico como la ausencia de UFC. Si el crecimiento ≥ 2 UFC ocurre en uno solo de los pozos con antibióticos, ya sea el que contiene isoniacida o el ocurre en uno solo de los pozos con antibióticos, ya sea el que contiene isoniacida o el que contiene rifampicina, se define la monoresistencia para determinado fármaco. Si el crecimiento ≥ 2 UFC se produce en ambos pozos con drogas, se define como MDR^{5,10,13}.

Controles internos

El uso de controles internos negativos (en cada placa con las muestras) y controles positivos (que se realizan cada día que se procesan las muestras) son esenciales para garantizar los resultados válidos de MODS. Los pozos de los controles internos son leídos e interpretados de la misma manera que los pozos con muestra. Para el control negativo, se espera que no exista crecimiento en los 4 pozos de la columna 3 (3A, 3B, 3C y 3D), si alguna colonia de micobacteria es observada en cualquiera de estos pozos, se ha producido contaminación cruzada y las placas deben ser desechadas. Los controles positivos se realizan en una placa aparte cada día que se procesan las muestras, 4 pozos no contienen drogas (2 corresponden a la cepa sensible y 2 a la cepa MDR), deben tener un crecimiento de micobacterias ≥ 2 UFC; el control sensible no debe crecer en ninguno de los pozos que contengan antibióticos y la cepa control resistente debe crecer en los pozos que contienen antibióticos. Si los controles positivos no funcionan como se espera, los resultados de susceptibilidad para las muestras procesadas el mismo día no son válidos (resultado indeterminado), se deben descartar todas las placas y reprocesar las muestras de las alícuotas guardadas o procesar nuevas muestras de esputo utilizando un nuevo stock de antibióticos y nuevas soluciones de trabajo.

Eliminación de las placas

Se deben mantener todas las placas en sus respectivas bolsas ziplock, colocarlas en bolsas de autoclave y sellar la bolsa; esterilizar en autoclave a 121 – 124°C durante 45-60 minutos y descartar las bolsas de autoclave ya esterilizadas en los lugares designados para este propósito. Como se ha mencionado la mayor preocupación se relaciona con la bioseguridad; los

medios líquidos representan un mayor riesgo en relación a la posibilidad de sufrir derrames y suspenderse en forma de aerosoles, de cualquier manera, la inoculación de la muestra se realiza una sola vez y después se sella en una bolsa ziplock, la cual no vuelve a abrirse¹⁰.

CONCLUSIONES

Cabe destacar que el MODS ha sido reconocido como un método válido para el diagnóstico de TB por la Organización Mundial de la Salud¹⁴. De manera que se ha planteado una potencial herramienta en la lucha contra la TB en el mundo y en nuestro medio, donde ya se realizaron algunas pruebas en laboratorios de la Escuela Técnica de Salud Boliviano Japonés de Cooperación Andina de la Ciudad de Cochabamba. El empleo generalizado de este método aún se encuentra en proceso de validación en nuestro medio.

Contribución de autores: todos los autores participaron de igual manera en la elaboración, confección y revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.** WHO, Geneva, 2006: 1-242.
2. World Health Organization. **Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing.** WHO report, Geneva, 2009.
3. World Health Organization. **AIDS epidemic update.** WHO report, Geneva, 2009.
4. Corbett EL, Watt CJ, et al. **The Growing Burden of Tuberculosis Global Trends and Interactions With the HIV Epidemic.** *Arch Intern Med* 2003; 163: 1009-21
5. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, et al. **Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB.** *N Engl J Med* 2006; 355: 1539-50.
6. Hurtado A. **Actualización en el diagnóstico de la Tuberculosis.** *Ed Cont Lab Clin* 2008; 12; 9-15.
7. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH et al. **Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in sputum by microscopic observation of broth cultures.** *The Tuberculosis Working Group in Peru. J Clin Microbiol* 2000; 38(3), 1203-8.
8. Iseman MD et al. **Rapid detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis.** *N Eng J Med* 2006; 355: 1606 – 8.
9. Caviedes L, Moore DA. **Introducing mods: A low-cost, low-tech tool for high-performance detection of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis.** *Indian J Med Microbiol* 2007; 25: 87-8.
10. Moore DA. **Future prospects for the MODS assay in multi-drug-resistance tuberculosis diagnosis.** *Future Microbiol* 2007; 2(2), 97-101.
11. Middlebrook, G., and M. L. Cohn. **Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods.** *Am J Public Health* 1958; 48: 844-53.
12. Middlebrook, G., M.L. Cohn, and W.B. Schaefer. 1954. **Studies on isoniazid and tubercle bacilli. II. The isolation, drug-susceptibility and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients.** *Am Rev Tuberc* 1954; 70: 852-72.
13. Coronel J, Roper M, Caviedes L, Moore DA. **MODS: Guía del usuario. Microscopic observation drug susceptibility assay.** Universidad Peruana Cayetano Heredia. Laboratorio de Investigación y Desarrollo. Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Área de Mycobacterium. (2008). 12.1 14082008.
14. World Health Organization. **Pathways to better diagnostics for tuberculosis: a blueprint for the development of TB diagnostics by the new diagnostics working group of the Stop TB Partnership.** WHO, Geneva, 2009.
15. Mantari A, Zimic M, Moore DA, Gilman R, Brady MF. **Computer pattern recognition of Mycobacterium tuberculosis in MODS culture.** Lima, Peru. Hopkins Fogarty Site Bethesda. (2009).
16. Moore AD, Mendoza D, Gilman R, Evan CA. **Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay, a Rapid, Reliable Diagnostic Test for Multidrug-Resistance Tuberculosis Suitable for Use in Resource-Poor Settings.** *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4432-7.
17. Moore DA, Caviedes L, Gilman R et al. **Infrequent MODS TB culture cross-contamination in a high-burden resource-poor setting.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56(1): 35-43.
18. World Health Organization & Stop TB Partnership. **New laboratory diagnostic tools for tuberculosis control.** WHO, Geneva, 2008.

Fe de erratas

Portada. Revista Ciencia médica 2010, volumen 13. Número 2. En la primera y segunda oración usted debió haber leído: Comparación del tratamiento en pacientes con tuberculosis (20-25 años) Hospital de Quillacollo y Hospital México gestión junio 2009-2010. En la séptima línea debió haber leído: Síndrome de Peutz-Jeghers y obstrucción intestinal baja. En la novena línea debió haber leído: Actinomicosis orofaríngea, una presentación cervicofacial. En la décima sexta línea debió haber leído: Alogenosis iatrogénica: el peligro de los biopolímeros.

Índice. Revista Ciencia médica 2010, volumen 13. Número 2. En el índice de casos clínicos usted debió haber leído: Absceso de Muslo, Sepsis y Embarazo. Nadir Peggy Ortiz Samur, Patricia Elizabeth Ortuño Lazarte, Suleydi Paniagua Sanchez, Gastón Aranibar; sin los números que seguían al nombre de cada autor.

Proceso de publicación: responsabilidad de autores, editores y revisores externos. Revista Ciencia médica 2010, volumen 13. Número 2:3-4. En el quinto párrafo (página 3), primera oración usted debió haber leído: La política editorial está explícita en los "requisitos generales para la publicación" de cada revista. En el octavo párrafo (página 4), primera oración, usted debió haber leído: ...como editores esperamos que las normas de publicación sean lo más claras posibles.

Evaluación de la investigación en las XXIV Jornadas de Residencia Médica Regional. Revista Ciencia médica 2010, volumen 13. Número 2:5. En el quinto párrafo primera oración (página 5), usted debió haber leído: ...se pueden extraer conclusiones dentro del rigor de los niveles de evidencia o grados de recomendación, a fin de poder aplicarlo a la práctica clínica.

Comparación del Tratamiento de Pacientes con tuberculosis (20-25 años), Hospital Quillacollo y Hospital México, Junio 2009-2010. Revista Ciencia médica 2010, volumen 13. Número 2:6-8. Bajo el título de resultados (página 7), en el tercer párrafo, primera oración debe obviar un cierre de paréntesis innecesario.