

# UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO  
FACULTAD DE POSGRADO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ARTÍCULOS PROFESIONALES DE ALTO NIVEL  
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA**

**TEMA:**

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de Dos Rondas con  
Reamplificación Desde gel para Detectar Dirofilaria Immitis en Perros de el  
Oro, Ecuador**

**Autor:** Fernando Lenin Aguilar Gálvez

**Tutor:** José Francisco Falconí Novillo

*Milagro, 2026*

DOI: <https://doi.org/10.70747/cr.v5i1.851>

---

*Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de Dos Rondas  
con Reamplificación Desde gel para Detectar Dirofilaria  
Immitis en Perros de el Oro, Ecuador*

---

Fernando Lenin Aguilar Galvez

<https://orcid.org/0000-0002-8245-9717>

[faguilarg2@unemia.edu.ec](mailto:faguilarg2@unemia.edu.ec)

Universidad Estatal de Milagro

Ecuador - Milagro

José Francisco Falconí Novillo

<https://orcid.org/0000-0003-2623-115X>

[jfalconin@unemi.edu.ec](mailto:jfalconin@unemi.edu.ec)

Universidad Estatal de Milagro

Ecuador - Milagro

---

---

## RESUMEN

La dirofilariosis cardiopulmonar por *Dirofilaria immitis* es una zoonosis transmitida por mosquitos que afecta a perros en regiones tropicales; su diagnóstico exige integrar pruebas serológicas y moleculares para evitar sobre- o subestimaciones. Este estudio tuvo como objetivo detectar molecularmente *D. immitis* en perros de la provincia de El Oro (Ecuador) mediante PCR punto final del gen COI y confirmar la identidad por secuenciación, incorporando una ruta de re-amplificación cuando aparecieron dímeros o bandas inespecíficas. Se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal con enfoque cuantitativo en 40 caninos con signos compatibles, evaluados mediante inmunocromatografía (IC); los IC positivos se retestearon y pasaron a PCR (amplicón ~150 pb). Cuando la primera ronda mostró perfiles subóptimos, purificamos la banda específica en gel y realizamos una segunda PCR con los mismos cebadores (dos rondas, no anidada). Los productos positivos se secuenciaron en doble dirección. La IC fue positiva en 24/40 (60,0%). La PCR confirmó *D. immitis* en 10/24 IC+ (41,7%) y no detectó en 14/24 (58,3%). La positividad por PCR se concentró en Machala (6 casos), seguida de Santa Rosa (3 casos) y Huaquillas (1 caso). El análisis estadístico sugirió diferencias en la distribución de casos positivos entre cantones ( $\chi^2 = 15,27$ ;  $p = 0,00048$ ); sin embargo, este hallazgo debe interpretarse con cautela debido al tamaño muestral limitado y a la distribución desigual de la muestra entre jurisdicciones. La re-amplificación desde banda purificada resolvió dímeros/inespecificidad y permitió obtener amplicones aptos para secuenciación. Concluimos que la serología aislada sobreestima la ocurrencia; la PCR con re-amplificación incrementa la especificidad y la certeza diagnóstica. Un algoritmo escalonado (IC + microfilarias → PCR con re-amplificación cuando aplique → secuenciación) optimiza el diagnóstico y la vigilancia de la dirofilariosis canina en El Oro

**Palabras clave:** *dirofilaria immitis*, perros, PCR convencional, diagnóstico molecular, secuenciación

---

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.  
El Editor y los Revisores declararon no tener conflicto de intereses.

Licencia: 



---

## *Two-Round Polymerase Chain Reaction (PCR) with Re-Amplification From Gel to Detect *Dirofilaria immitis* in Dogs From el Oro, Ecuador*

---

---

### ABSTRACT

Cardiopulmonary dirofilariasis caused by *Dirofilaria immitis* is a mosquito-borne zoonosis that affects dogs in tropical regions; its diagnosis requires integrating serological and molecular tests to avoid over- or underestimation. This study aimed to detect *D. immitis* molecularly in dogs from the province of El Oro (Ecuador) using endpoint PCR of the COI gene and to confirm its identity by sequencing, incorporating a re-amplification route when nonspecific dimers or bands appeared. An observational, descriptive, and cross-sectional study with a quantitative approach was conducted on 40 dogs with compatible signs, evaluated by immunochromatography (IC). Positive IC samples were retested and then subjected to PCR (amplicon ~150 bp). When the first round showed suboptimal profiles, the specific band was purified on a gel, and a second PCR was performed with the same primers (two rounds, not nested). Positive products were sequenced in both directions. The IC was positive in 24/40 (60.0%). PCR confirmed *D. immitis* in 10/24 IC+ cases (41.7%) and was not detected in 14/24 (58.3%). PCR positivity was concentrated in Machala (6 cases), followed by Santa Rosa (3 cases) and Huaquillas (1 case). Statistical analysis suggested differences in the distribution of positive cases among cantons ( $\chi^2 = 15.27$ ;  $p = 0.00048$ ); however, this finding should be interpreted with caution due to the limited sample size and the uneven distribution of the sample among jurisdictions. Re-amplification from the purified band resolved dimerism/nonspecificity and yielded amplicons suitable for sequencing. We conclude that serology alone overestimates occurrence; PCR with re-amplification increases specificity and diagnostic certainty. A stepwise algorithm (IC + microfilariae → PCR with re-amplification when applicable → sequencing) optimizes the diagnosis and surveillance of canine dirofilariasis in El Oro

**Keywords:** *dirofilaria immitis*, dogs, conventional PCR, molecular diagnosis, sequencing

---

The authors declare no conflict of interest.

The Editor and the Reviewers declared no conflict of interest.

License: 



## INTRODUCCIÓN

La dirofilariosis cardiopulmonar, causada por el nematodo filárido *Dirofilaria immitis*, es una parasitosis vectorial de importancia en medicina veterinaria y salud pública por su distribución cosmopolita y potencial zoonótico. El ciclo de transmisión involucra mosquitos culícidos (p. ej., *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia*) que inoculan larvas L3; éstas se desarrollan hasta adultos en el árbol vascular pulmonar y cavidades cardíacas derechas de su hospedador definitivo—principalmente el perro—, con reportes esporádicos en felinos y en humanos como hospedadores aberrantes, tratándose de una infección infrecuente y generalmente manifiesta como hallazgo pulmonar incidental. (American Heartworm Society [AHS], 2024). La presentación clínica varía según carga parasitaria, respuesta inmune y tiempo de infección, y puede incluir desde cuadros subclínicos hasta endarteritis proliferativa, hipertensión pulmonar e insuficiencia cardíaca derecha, además de fenómenos inflamatorios sistémicos relacionados con microfilarias (AHS, 2024).

En Ecuador, la evidencia disponible sobre *Dirofilaria immitis* en perros aún es limitada, pero ya existen reportes que confirman su circulación en distintas zonas del país. En San Cristóbal, Galápagos, se detectó la presencia de microfilarias de *D. immitis* en 10 de 587 perros muestreados (1,7%), constituyendo el primer reporte para esa isla. Asimismo, en el cantón Sucre se documentó la presencia del parásito en perros de un albergue, y en Guayaquil se notificó seropositividad en caninos evaluados mediante ELISA. Estos antecedentes sugieren que la infección está presente en diversos contextos ecológicos del país, pero persisten vacíos de información en provincias costeras continentales como El Oro, donde las condiciones climáticas y vectoriales podrían favorecer la transmisión (Culda y col., 2022).

En la última década, múltiples determinantes eco-epidemiológicos han favorecido la persistencia y expansión de la infección: el aumento de temperaturas, la urbanización no



planificada y la movilidad de animales domésticos amplían las ventanas de transmisión y generan “hotspots” urbanos y periurbanos, sobre todo en zonas costeras tropicales como la provincia de El Oro, Ecuador. Estas dinámicas son coherentes con estimaciones y metaanálisis que documentan prevalencias globales variables ( $\approx 10\text{--}11\%$  a escala mundial, con heterogeneidad por clima, densidad vectorial y uso de profilaxis) y con reportes regionales de alta transmisión cuando la prevención es irregular (Anvari et al., 2020; Genchi & Kramer, 2020). A nivel regional y nacional se han descrito retos diagnósticos por discordancias entre métodos parasitológicos (detección de microfilarias), pruebas de antígeno y técnicas moleculares. En América Latina se insiste en algoritmos combinados y confirmación genética para resolver resultados inesperados—especialmente cuando la probabilidad preprueba es baja o el cuadro clínico no es congruente—y para distinguir *D. immitis* de otras filarias (p. ej., *Acanthocheilonema reconditum*), reduciendo sesgos de vigilancia (AHS, 2024; Esteban-Mendoza et al., 2024). En Ecuador, la detección de *D. immitis* en lobos marinos de Galápagos resalta el nexo doméstico-silvestre y la necesidad de vigilancia sostenida en el continente bajo un enfoque de Una Salud (Gregory et al., 2023).

El diagnóstico clásico se ha apoyado en la detección de microfilarias (p. ej., Knott modificado) y en pruebas serológicas para antígeno de hembras adultas. La biología molecular ha transformado el abordaje diagnóstico al permitir la identificación específica mediante PCR—incluida la PCR punto final en doble ronda (anidada)—dirigida a marcadores como el COI mitocondrial, con confirmación por secuenciación Sanger para fines de caracterización genética y filogenética (Oh et al., 2017; Morchón et al., 2025). Cuando una PCR inicial produce dímeros de cebadores (PD) o productos inespecíficos, una estrategia válida es aislar por tamaño el amplicón correcto en agarosa y usarlo como molde en una segunda PCR. Ante productos inespecíficos en una PCR inicial, es posible aplicar estrategias de re-amplificación



que mejoren la especificidad y permitan recuperar amplicones adecuados para la confirmación por secuenciación. De esta manera la presente investigación tuvo como objetivo detectar molecularmente *D. immitis* mediante PCR punto final en doble ronda (similar a una nested PCR) dirigida al gen COI y confirmar la identidad por secuenciación Sanger en perros de la provincia de El Oro, Ecuador, así como con la necesidad de fortalecer la precisión diagnóstica cuando la amplificación por PCR presenta bandas inespecíficas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio**

Estudio observacional, descriptivo y transversal con enfoque cuantitativo.

### **Ámbito del estudio**

Provincia de El Oro, Ecuador: Cantones Machala, Santa Rosa y Huaquillas (litoral sur, clima tropical húmedo; 24–27 °C; altitud 0–20 m s. n. m.). La selección geográfica se sustentó en reportes locales de circulación de *Dirofilaria immitis* y en la alta densidad de población canina.

### **Población y selección muestral**

En un periodo de tres meses, se evaluaron 40 perros con signos clínicos compatibles con dirofilariosis que acudieron a clínicas veterinarias de Machala, Santa Rosa y Huaquillas. La muestra se obtuvo mediante muestreo no probabilístico por conveniencia. De los animales evaluados, 24 presentaron resultado positivo en la prueba inmunocromatográfica (CaniV-4 Test Kit; Anigen) para *D. immitis* y fueron seleccionados para el análisis molecular. Estas muestras fueron remitidas a PCR, y los amplicones positivos se enviaron a secuenciación bidireccional. Las secuencias resultantes se curaron y analizaron para su comparación filogenética con referencias regionales.

### **PCR punto final**

Se procesaron 200 µL de sangre en EDTA con Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo



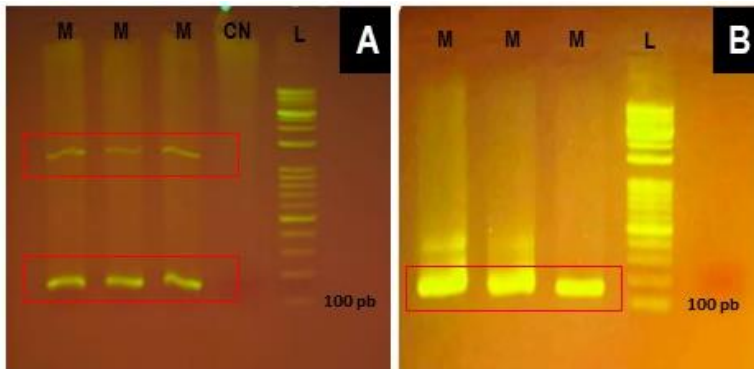
Research, cat. D4068), bajo condiciones de bioseguridad. La detección molecular se realizó mediante PCR punto final dirigida al gen COI mitocondrial de *D. immitis* (amplicón esperado  $\approx$ 150 pb). Se emplearon los siguientes cebadores para el gen COI de *Dirofilaria immitis*: Forward, ATT GGG TGC CCC TGA AAT GG; Reverse, CCC TCT ACA CTC AAA GGA. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20  $\mu$ L, compuesto por 10  $\mu$ L de Taq 2 $\times$  PCR Master Mix (Marca abm; Cat. N $^\circ$ . G888), 0,8  $\mu$ L de cada cebador (10 pmol/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L de ADN molde y 6,4  $\mu$ L de agua grado molecular. El programa térmico consistió en desnaturalización inicial a 95  $^\circ$ C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95  $^\circ$ C por 20 s (desnaturalización), 60  $^\circ$ C por 20 s (alineamiento) y 72  $^\circ$ C por 40 s (extensión), con una extensión final a 72  $^\circ$ C por 7 min. En cada corrida se incluyeron controles negativos (NTC) y un control positivo previamente validado en el laboratorio.

### **Electroforesis, purificación en gel y re-amplificación por PCR**

Los productos se separaron en agarosa 2 % con visualización por intercalante estándar. Ante presencia de dímeros de cebadores o bandas inespecíficas, se implementó un flujo de re-amplificación para recuperar el producto específico. La escisión del amplicón objetivo ( $\approx$ 150 pb) se realizó con pipeteo suave directamente a la banda diana durante la electroforesis, evitando las zonas alejadas al amplicón. Para la segunda PCR (re-amplificación; no anidada) se usó el mismo par de cebadores e idéntica química (20  $\mu$ L finales), empleando 2  $\mu$ L del extraído de electroforesis inicial como plantilla. Ciclos y extensión se mantuvieron como en la primera ronda. Verificación por gel (2 %) del amplicón limpio ( $\sim$ 150 pb). Los productos específicos se purificaron previo a secuenciación.



**Figura 1. Doble PCR para optimización del amplicón.** La primera amplificación mostró doble banda inespecífica asociada a dímeros de primers (A). Tras la reamplificación, se obtuvo un único amplicón específico y bien definido, adecuado para secuenciación (B). **M** (Muestra), **CN** (Control negativo) y **L** (Leader).



Los datos obtenidos se organizaron en una matriz en Microsoft Excel y se analizaron mediante estadística descriptiva e inferencial. Se calcularon frecuencias absolutas y relativas para los resultados de inmunocromatografía (IC) y PCR. Para evaluar la asociación entre la positividad por PCR y el cantón de procedencia se aplicó la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Se consideró un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS, versión 25.

### Consideraciones éticas

El muestreo se realizó con consentimiento informado de los tutores y conforme a normas institucionales de bienestar animal y bioseguridad vigentes. Los datos fueron anonimizados para proteger la privacidad de los propietarios.

## RESULTADOS

### Tamizaje serológico por inmunocromatografía (IC)

Se evaluaron 40 caninos con signos compatibles con dirofilariosis. El tamizaje por IC resultó positivo en 24/40 (60,0%) y negativo en 16/40 (40,0%). Estos 24 casos IC positivos fueron elegibles para confirmación molecular.

## Confirmación molecular por PCR punto final (COI)

De los 24 caninos IC positivos, la PCR punto final confirmó la presencia de *Dirofilaria immitis* en 10/24 (41,7%), mientras que 14/24 (58,3%) no fueron detectados por la prueba molecular. En un subconjunto con dímeros de cebadores/bandas inespecíficas en la primera ronda, se aplicó re-amplificación desde el amplicón purificado en gel (dos rondas, mismos cebadores; no anidada), obteniéndose finalmente un amplicón limpio (~150 pb) para su lectura y posterior secuenciación.

## Distribución por cantón

La positividad por PCR se concentró en Machala (6 casos), seguida de Santa Rosa (3 casos) y Huaquillas (1 caso). La asociación entre resultado PCR y cantón fue estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 15,27$ ;  $p = 0,00048$ ), evidenciando una distribución no homogénea de casos entre jurisdicciones.

**Tabla 1.** Distribución por cantones de los resultados IC/PCR.

Prueba	Cantones			Total
	Machala	Santa Rosa	Huaquillas	
Población	25	10	5	40
Inmunocromatográfica	16	6	2	24
PCR	6	3	1	10
% IC / PCR Positivo	37.5	50	50	41.7

## Secuenciación y verificación

Los amplicones específicos (~150 pb) se purificaron y secuenciaron en doble dirección. Las lecturas se limpiaron y ensamblaron en consenso, confirmando identidad con secuencias de referencia de *D. immitis*.



## DISCUSIÓN

El estudio confirma la circulación activa de *Dirofilaria immitis* en El Oro y evidencia una brecha diagnóstica entre el tamizaje por IC, si bien el 60,0% de los caninos evaluados resultó positivo por inmunocromatografía, la confirmación molecular se realizó exclusivamente en los 24 casos IC positivos, de los cuales 41,7% fueron confirmados por PCR. Por ello, estos porcentajes no deben interpretarse como estimaciones comparables de prevalencia poblacional, sino como etapas sucesivas de tamizaje y confirmación dentro de un algoritmo diagnóstico escalonado.

El aporte metodológico clave fue la re-amplificación por PCR desde el amplicón purificado en gel (dos rondas con los mismos cebadores; no anidada) en muestras con dímeros o bandas inespecíficas. Este procedimiento permitió recuperar un producto más específico y bien definido, adecuado para secuenciación Sanger, fortaleciendo la validez de la confirmación molecular. En términos operativos, la re-amplificación funcionó como una estrategia útil para mejorar la calidad del amplicón cuando la primera ronda mostró perfiles subóptimos, favoreciendo la confirmación diagnóstica de los casos analizados sin modificar el diseño de cebadores.

Desde la perspectiva epidemiológica, la heterogeneidad espacial (mayor positividad en Machala y Santa Rosa) sugiere micro-ambientes favorables al vector y diferencias operativas en exposición y profilaxis. En conjunto, los resultados sostienen una vigilancia molecular robusta que integre: (i) tamizaje serológico, (ii) confirmación por PCR con ruta de re-amplificación cuando haya dímeros/inespecificidad, y (iii) secuenciación y depósito de secuencias para trazabilidad genética. Este enfoque reduce la incertidumbre diagnóstica, mejora la calidad de los datos para la toma de decisiones y optimiza la vigilancia de la dirofilariosis canina en la provincia de El Oro.



## CONCLUSIONES

Este estudio aporta evidencia de circulación de *Dirofilaria immitis* en caninos de la provincia de El Oro, Ecuador. De los 40 animales evaluados, 24/40 (60,0%) resultaron positivos por inmunocromatografía y, dentro de este subgrupo, la PCR confirmó la infección en 10/24 (41,7%). Estos hallazgos respaldan la utilidad de integrar el tamizaje serológico con confirmación molecular. La re-amplificación desde bandas purificadas en gel mostró utilidad para obtener amplicones aptos para secuenciación en muestras con productos inespecíficos, mientras que la mayor concentración de casos confirmados en Machala y Santa Rosa sugiere una distribución espacial heterogénea de la infección. No obstante, los resultados deben interpretarse considerando el tamaño muestral y el hecho de que la PCR se aplicó únicamente a los casos positivos por inmunocromatografía. Estudios futuros con mayor cobertura muestral y confirmación molecular en distintos subgrupos diagnósticos permitirán fortalecer la vigilancia epidemiológica de la dirofilariosis canina en Ecuador.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Heartworm Society. (2024). Canine heartworm guidelines: *Prevention, diagnosis, and management of heartworm (Dirofilaria immitis) infection in dogs* (Rev. 2024). <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines>
- Anvari, D., Narouei, E., Daryani, A., Sarvi, S., Moosazadeh, M., Ziaei Hezarjaribi, H., Narouei, M. R., & Gholami, S. (2020). The global status of *Dirofilaria immitis* in dogs: A *systematic review and meta-analysis based on published articles*. *Research in Veterinary Science*, 131, 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.002>
- Culda, C. A., Dionnet, R., Barbu, A. C., Cârstolovean, A. S., Dan, T., Grijalva, J., Espin, P., Vinueza, R. L., Cruz, M., Páez-Rosas, D., Renato, L., & Mihalca, A. D. (2022). *The*



*presence of Dirofilaria immitis in domestic dogs on San Cristobal Island, Galapagos.*

*Pathogens*, 11(11), Article 1287. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111287>

Esteban-Mendoza, M. V., Lastre-Meza, N. M., Márquez-Valderrama, J. F., et al. (2024).

*Microfilaremic infection in canine filariasis in Colombia: A challenge in morphological and molecular diagnostics. Frontiers in Veterinary Science*, 11, Article 1368307.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1368307>

Gandasegui, J., Doyle, S. R., Sallé, G., et al. (2024). *Genome structure and population genomics of*

*the canine heartworm Dirofilaria immitis. International Journal for Parasitology.*

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2023.07.006>

Gregory, T. M., Livingston, I., Hawkins, E. C., et al. (2023). *Dirofilaria immitis identified in*

*Galapagos sea lions (Zalophus wollebaeki): A wildlife health and conservation concern.*

*Journal of Wildlife Diseases*, 59(3), 487–494. [https://doi.org/10.7589/JWD-D-22-](https://doi.org/10.7589/JWD-D-22-00119)

[00119](https://doi.org/10.7589/JWD-D-22-00119)

Morchón, R., Simón, F., & Montoya-Alonso, J. A. (2025). *New insights into the phylogeographic*

*history of Dirofilaria immitis. Animals*, 15(12), Article 1694.

<https://doi.org/10.3390/ani15121694>

Barrantes Murillo, D. F., Moye, A., & Wang, C. (2024). *Heat Treatment Augments Antigen*

*Detection of Dirofilaria immitis in Apparently Healthy Companion Dogs (3.8% to 7.3%):*

*Insights from a Large-Scale Nationwide Survey across the United States. Pathogens*

(Basel, Switzerland), 13(1), 56. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010056>

Oh, I. Y., Kim, K. T., & Sung, H. J. (2017). *Molecular Detection of Dirofilaria immitis Specific*

*Gene from Infected Dog Blood Sample Using Polymerase Chain Reaction. Iranian*

*journal of parasitology*, 12(3), 433–440.

Yang, Z., Pothukuchy, A., Figueroa, D. M., et al. (2020). *Eliminating primer dimers and*



improving SNP detection using hot-start/self-avoiding primer strategies. *Biology Methods and Protocols*. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa004>

Zintz, C. B., & Beebe, D. C. (1991). Rapid re-amplification of PCR products purified in low melting point agarose gels. *BioTechniques*, 11(2), 158–162.

La Revista utiliza códigos para identificar al Editor y al equipo de PARES REVISORES. Si tiene dudas o consultas, contacte a: [contacto@cienciayreflexion.org](mailto:contacto@cienciayreflexion.org)  
Código de Editor: 104  
Código de Revisores: 851





Ciencia y Reflexión, Revista Científica Multidisciplinaria  
ISSN: 3045-5537

## CERTIFICADO DE PUBLICACIÓN

Se hace constar que el artículo:

***Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de Dos Rondas con Reamplificación Desde gel para Detectar Dirofilaria Immitis en Perros de el Oro, Ecuador*** ha sido publicado en la edición Enero - Marzo, 2026, Volúmen 5, Número 1  
Verificable en nuestra plataforma: <https://cienciayreflexion.org/>

Con DOI: <https://doi.org/10.70747/cr.v5i1.851>

URL: <https://cienciayreflexion.org/index.php/Revista/article/view/version/851>

y corresponde la autoría a:

***Fernando Lenin Aguilar Galvez***  
***José Francisco Falconí Novillo***

Se expide la presente, a pedido de la parte interesada y para los fines que diere lugar en fecha 24 de marzo del 2026.

Para consultas puede contactarnos a través del correo oficial de la revista

[contacto@cienciayreflexion.org](mailto:contacto@cienciayreflexion.org)

Dr. José Manuel Jiménez Rodríguez  
Editor en Jefe



**UNEMI**  
UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

*¡Evolución académica!*

@UNEMIEcuador

