Triyodotironina Libre (ft3)
Código de producto: 1375-300

Uso: Determinación cuantitativa de la concentración de Triyodotironina Libre en Suero humano por medio del inmuno ensayo de quimioluminiscencia de microplacas (CLIA). Los niveles de ft3 reflejan la cantidad de T3 disponible para las células pudiéndose determinar por consiguiente el estado metabólico clínico de T3.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

La Triyodotironina, que es una hormona de la tiroides, circula en el torrente sanguíneo enlazada casi completamente (> 99.5%) a proteínas portadoras (1,2). La principal proteína de transporte es la globulina enlazada con la tiroxina (TBG). Sin embargo, tan solo la porción libre (sin enlace) de la Triyodotironina se considera como responsable de la acción biológica. Por otra parte, las concentraciones de las proteínas portadoras se alteran en muchas condiciones clínicas, tales como el embarazo. En condiciones normales de funcionamiento de la tiroides, las concentraciones de las proteínas portadoras se alteran, cambian el nivel de Triyodotironina total luego las concentraciones de Triyodotironina libre permanecen constantes. Por lo tanto, las mediciones de las concentraciones de Triyodotironina Libre se correlacionan de manera más confiable con el estado clínico que con los niveles de Triyodotironina total

Por ejemplo, el incremento de los niveles de Triyodotironina total asociados con el embarazo, anticonceptivos orales y terapia de estrógeno da como resultados de niveles totales de T3 mas elevados, en tanto que la concentración del T3 libre permanece básicamente sin modificaciones.

Esta metodología de inmuno-ensayo por quimioluminiscencia de microplacas le proporciona al laboratorista una óptima sensibilidad con bajos requerimientos de manipulación técnicas dentro de una determinación directa del T3 Libre. De acuerdo con este método, suero de referencia, la muestra del paciente o el control se agregan en primer lugar a un pozo de microplacas. El conjugado enzima-T3 (método análogo), se adiciona y luego se mezclan los reactivos. Se obtiene una reacción de competencia entre el conjugado de la enzima y la Triyodotironina Libre para un número limitado de sitios de combinación de anticuerpos inmovilizados en el pozo.

Después de terminar el periodo requerido de incubación, el conjugado enzima - Triyodotironina Libre enlazado a anticuerpos se separa del conjugado enzima Triyodotironina sin enlace por aspiración o decantación. La actividad de la enzima presente sobre superficie del pozo es cuantificada mediante reacción con el sustrato adecuado para producir luz.

El uso de varios sueros de referencia de concentraciones conocidas de Triyodotironina Libre permite la construcción de un grafico de actividad y concentración. A partir de la comparación con la curva de respuesta de dosis, se puede correlacionar la actividad de una muestra desconocida con la concentración de la Triyodotironina Libre.

PRINCIPIO

Inmunoensayo de quimioluminiscencia competitiva – método análogo para T3 libre

Los reactivos esenciales requeridos para un inmuno ensayo enzimático de fase sólida incluyen el anticuerpo inmovilizado T3, el conjugado enzima –T3 y el antígeno T3 libre nativo. El conjugado enzima –T3 libre no debe tener ningún enlace medible con las proteínas séricas especialmente TBG y albúmina. El método logra este propósito al mezclar el anticuerpo inmovilizado, el conjugado enzima –T3 y un suero que contiene el antígeno nativo T3 libre, se obtiene una reacción de competencia entre el T3 libre nativo y el conjugado enzima –T3 para un número ilimitado de sitios de enlace de insolubilización. La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:

AC_{C,W} = Anticuerpo Inmovilizado específico (cantidad constante)

Ag = Antígeno nativo (cantidad variable)

Enz Ag = Conjugado de enzima – Antígeno (Cantidad constante)

AgAC_{C,W} = Complejo antígeno – anticuerpo

Enz Ag AC_{C,W} = Complejo anticuerpo-Conjugado enzima –antígeno.

k_a = Tasa Constante de asociación

k_{-a} = Tasa Constante de Disociación

K = k_a/k_{-a} = Equilibrio constante

Después de lograr el equilibrio, la fracción ligada al anticuerpo se separa del antígeno no ligado mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática, determinada por la reacción con un sustrato que genere luz, dentro de la fracción de enlace de anticuerpos será inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre nativo. Al Utilizar varias referencias de sueros de valores conocidos de antígenos, se puede generar una curva de respuesta de dosis a partir de la cual se evalúa la concentración de antígeno de una muestra desconocida.

REACTIVOS

Materiales suministrados

A. Suero de referencia de origen humano – 1 ml/vial- A-F Iconos E

6 viales de sueros de referencia para Triyodotironina libre a concentraciones aproximadas de 0(A), 1.0 (B), 3.0(C), 5.0 (D), 8.0 (E) y 16.0 (F) pg/ml. Almacenar de 2-8°C. Un preservante ha sido adicionado. *Los niveles exactos están dados sobre las etiquetas de acuerdo con las bases específicas del lote.

Para unidades SI: 1pg/ml x 1.536 =pmol/L

B. Reactivo trazador ft3- 13 ml vial – icono

Un (1) vial de conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) -Triyodotironina en una matriz estabilizadora de albúmina Bovina. Se agregó un preservante. Almacenar de 2-8°C.

C. Pozos de reacción luminosa - 96 pozos – icono

Una microplaca blanca de 96 pozos recubiertos con suero de anti- Triyodotironina de oveja y empacada en una bolsa de aluminio con un agente secante. Almacenar de 2-8°C.

D. Solución de lavado concentrado – 20 ml- Icono

Un (1) vial que contiene un surfactante en solución salina amortiguada. Se agregó un preservante. Almacenar de 2-30°C. (Ver sección preparación de reactivos)

E. Reactivo de señal A – 7.0 ml/vial- Icono C^A

Un (1) frasco que contiene Luminol en Amortiguador de pH. Almacenar de 2-8°C. (Ver sección preparación de reactivos).

F. Reactivo de señal B – 7.0 ml/vial- Icono C^B

Un (1) frasco que contiene Peroxid de Hidrógeno (H₂O₂) en búfer. Almacenar de 2-8°C. (Ver sección sobre preparación de reactivos).

G. Instrucciones del producto

Material adicional (No suministrado):

- Pipeta(s) de 50µl con una precisión superior a 1.5%.
- Dispensador(es) para mediciones repetitivas de 0.100 ml y 0.350ml con una precisión superior al 1.5%.
- Dispensador de volumen graduable (200-1000µl) para diluciones de sustrato.
- Lavador de microplacas o botella de lavado (opcional)

5. Luminómetro de microplacas

6. Tubos de ensayo para dilución de reactivo de señal A y B

7. Papel absorbente para secar los pozos de microplacas

8. Envoltura plástica o cubiertas de microplacas para los pasos de incubación

9. Aspiradora al vacío (opcional) para los pasos de lavado

10. Cronometro

11. Materiales para control de calidad

Nota 1: No utilizar los reactivos después de la fecha de la fecha de vencimiento del kit.

Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por 60 días cuando son almacenados de 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos anteriores están diseñados para una sola microplaca de 96 pozos.

PRECAUCIONES

Para uso Diagnóstico in Vitro

No para uso externo o interno en humanos o animales

Todos los productos que contienen suero humano han sido hallados no reactivos para antígeno de superficie de hepatitis B, VIH 1 y 2 y anticuerpos HCV según pruebas exigidas por la A. Ninguna prueba puede asegurar completamente la ausencia de agentes infecciosos. Todos los productos de suero humano deben manipularse como potencialmente peligrosos y con capacidad de transmitir enfermedades. Las buenas practicas de laboratorio para el manejo de productos sanguíneos pueden ser encontrados en el Centro de Control de Enfermedades/ Instituto Nacional de Salud, "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", 2da Edición, 1988, HHS Publicación N° (CDC) 88-8395.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se deben emplear las precauciones en la recolección de muestras por punción venosa para las muestras de suero o sangre. La sangre se recolecta por punción venosa en un tubo pleno tapa roja sin aditivos o barrera de gel. Permitir que la sangre coagule. Centrifugue la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras pueden ser refrigeradas de 2-8°C por un periodo máximo de 48 horas. Si la muestra no puede ser ensayada dentro de este tiempo, la muestra puede ser almacenada a temperatura de -20°C por hasta 30 días. Cuando ensayamos en duplicado, se requiere 0.10ml de las muestras.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Búfer de Lavado

Diluya el contenido de concentrado de lavado en 1000 ml con agua destilada o des ionizada en un recipiente adecuado de almacenamiento. Almacenar a temperatura ambiente de 20-27°C.

2. Solución de trabajo Reactivo de Señal – almacenar de 2-8°C.

Determine la cantidad de reactivos necesarios y prepare mezclando porciones iguales de reactivo de señal A con reactivo de señal B en un recipiente limpio. Por ejemplo, adicionar 1ml de A y 1ml de B por dos (2) tiras de 8 pozos (se prepara un pequeño exceso de solución) descartar la parte no utilizada dentro de las siguientes 36 horas del mezclado. Si se conoce con anticipación que se van a utilizar completamente los reactivos, dentro del límite de tiempo antes señalado, Vierta el contenido del reactivo de señal B dentro del reactivo de señal A y etiquetar según corresponda.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Antes de seguir adelante con el ensayo, todos los reactivos, sueros de referencia y controles deberán estar a temperatura ambiente (20-27°C).

- Formatee los pozos de microplacas para cada suero de referencia, control y muestras de paciente que se vaya a ensayar en duplicado. Colocar las tiras no utilizadas de microplacas nuevamente en la bolsa de aluminio, sellar y almacenarlas de 2-8°C.
- Pipetee 0.050 ml (50µl) del suero de referencia, control o muestras dentro de los pozos asignados.

3. Adicione 0.100ml (100µl) de solución de reactivo trazador ft3 a todos los pozos.

4. Agite suavemente la micro-placa durante 20-30 segundos, mezclar y cubrir.

5. Incube durante 45 minutos a temperatura ambiente.

6. Elimine el contenido de la microplaca mediante decantación o aspiración. Si es por el método de decantación, secar la placa con papel absorbente.

7. Adicione 350µl de búfer de lavado (ver Sección reparación de Reactivos), decante (golpear y secar) o aspire. Repita 4 veces más para obtener un total 5 lavados. **Se puede utilizar un lavador automático o manual de placas. Seguir las instrucciones del fabricante para asegurar el uso apropiado. Si se utiliza un frasco de lavado, llenar cada pozo oprimiendo el recipiente (evitar la formación de burbujas de aire) distribuir la solución del lavado. Decante la solución de lavado y repita 4 veces adicionales.**

8. Adicione 0.100 ml (100µl) del reactivo de señal de trabajo a todas las pozos (Ver sección Preparación de Reactivos). **Siempre adicione reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.**

9. Incube 5 minutos en la oscuridad

10. Lea las unidades de luz relativas en cada pozo durante 0.2 – 1.0 segundos. Los resultados deberán leerse dentro de los 30 minutos contados a partir de la adición de la solución de sustrato.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar controles externos a niveles en los rangos de hipotiroides, eutiroides e hipertiroide para monitorear el desempeño de los ensayos. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y los valores determinados en cada procedimiento de prueba realizada. Se mantendrán gráficos de control de calidad para hacerle un seguimiento al desempeño de los reactivos suministrados. Se deberán utilizar métodos estadísticos pertinentes para evaluar las tendencias. Una desviación significativa a partir de los datos establecidos de desempeño puede indicar que hay cambios no perceptibles en condiciones experimentales o degradación de los reactivos del kit. Los reactivos frescos serán usados para determinar la razón para las variaciones.

RESULTADOS

Una curva dosis respuesta es usada para determinar la concentración de Triyodotironina Libre en muestras desconocidas.

- Registre los valores RLUs (Unidades Relativas de Luz) obtenidos a partir de la impresión de los resultados de las lecturas del lector de microplacas como se señala en el Ejemplo 1.
- Grafique los RLU para cada suero de referencia en duplicado vs. la concentración ft3 correspondiente en pg/ml sobre un papel de gráfica lineal.
- Trace la curva de mejor ajuste a través de los puntos graficados.
- Determine la concentración de ft3 para un valor desconocido, ubicar los RLUs promedio para cada dato desconocido en el eje vertical del grafico, encuentre el punto de intersección sobre la curva y lea la lectura de la concentración (pg/ml) a partir del eje horizontal del grafico (los duplicados de muestras desconocidas pueden promediarse según se indica). En el siguiente ejemplo, el RLU promedio (79179) del valor desconocido se intercepta con la curva de calibración en una concentración de ft3 (2.45 pg/ml) (ver figura 1)

Nota 1: Se puede igualmente utilizar el software de reducción de datos computarizados diseñados para ensayos de quimioluminiscencia con el fin de obtener la reducción de datos. Los duplicados de los valores desconocidos se pueden promediar como se indica (ver Figura 1)

Nota 2: Monobind puede asistir al laboratorio en la adquisición e implementación de equipos / software para medir e interpretar los datos de quimioluminiscencia.

Ejemplo 1

Muestra I.D.	Pozo Nombre	RLU (A)	Media RLU (B)	Valor (pg/ml)
Cal A	A1	98765	100000	0.00
	B1	101235		
Cal B	C1	90366	90042	1.0
	D1	89719		
Cal C	E1	74696	74761	3.0
	F1	74825		
Cal D	G1	58669	57943	5.0
	H1	57217		
Cal E	A2	41951	43463	8.0
	B2	44976		
Cal F	C2	28573	28138	16.0
	D2	27703		
Paciente 1	E2	79942	79179	2.45
	F2	78416		

* Los datos presentados en el ejemplo 1, Fig. 1 son únicos y exclusivamente para ilustración y no deben utilizarse en lugar de curva de respuesta de dosis que se debe preparar con cada ensayo. Adicionalmente los RLU de los calibradores han sido normalizados a 100,000 RLU para el calibrador A (mayor producción de luz). Esta conversión minimiza las diferencias causadas por la eficiencia de los diversos instrumentos que puedan ser utilizados para medir la producción de luz.

PARÁMETROS DE CC

Con el fin de que se consideren válidos los resultados del ensayo, se deberá cumplir con los siguientes criterios:

- La curva de respuesta de dosis debe estar dentro de parámetros bien establecidos
- Cuatro de cada 6 pools de control de calidad deben ubicarse dentro de los rangos establecidos.

ANÁLISIS DE RIESGOS

A. Desempeño del análisis

- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo sea mantenido en forma constante para obtener resultados reproducibles.
- El pipeteo de las muestras no se extenderá más de 10 minutos para evitar derivar el análisis.
- No se deben emplear muestras altamente lipémicas, Hemolizadas o contaminadas.
- Si más de 1 placa es usada, se recomienda repetir la curva de respuesta a la dosis.
- La adición del reactivo de señal inicia una reacción cinética por lo tanto el reactivo de señal debe ser adicionado en la

misma secuencia para eliminar cualquier derivación de tiempo durante la reacción.

- La falla al remover solución adherida en los pasos de aspiración o decantación puede resultar en replicación baja y resultados incorrectos.
- Usar los componentes del mismo grupo no mezclar los reactivos de diferentes conjuntos.
- Es esencial un pipeteo preciso y exacto así como seguir el tiempo exacto y la temperatura requerida. Cualquier desviación de las instrucciones de uso puede arrojar resultados inexactos.
- Se deben seguir las buenas prácticas de laboratorio todos los estándares nacionales aplicables, regulaciones y leyes de manera estricta para asegurar el cumplimiento y uso adecuado del dispositivo.
- Es importante calibrar todos los equipos, por ejemplo: pipetas, lectores, lavadores y/o instrumentos automatizados con este reactivo y realizar un mantenimiento preventivo rutinario

11. El análisis de riesgo – como lo requiere la directiva IVD 98/79/EC de la marca CE- para estos y otros dispositivos elaborados por Monobind, pueden ser solicitados vía Email: Monobind@monobind.com

B. Interpretación

- Los resultados de laboratorio por si solos son únicamente un aspecto para determinar el cuidado del paciente y no deben ser la única base para una terapia, particularmente si los resultados están en conflicto con otros determinantes.
- Para resultados de pruebas válidas, los controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos listados y requerimientos del ensayo.
- Si los kits de prueba están alterados, ya sea por mezcla de partes de diferente kits, lo cual puede producir resultados de prueba falsos o si los resultados son interpretados incorrectamente, Monobind no tendrá responsabilidad.
- Si se utiliza el sistema de reducción de datos controlados por Computador para interpretar los resultados del ensayo, es necesario que los valores de predicción para los calibradores se ubiquen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
- Reportar los eventos en los que un paciente por cualquier motivo presente una lectura superior a la del calibrador mas elevado (por ejemplo > 20pg/ml). No tratar de diluir las muestras. Las variaciones TBG de diferentes matrices no permitirán que la hormona T3 libre se diluya serialmente.
- Se sabe que diversos fármacos afectan en enlace de la Triyodotironina con las proteínas portadoras de la hormona de la tiroides o su metabolismo con el T3 complicando la interpretación de los resultados del T3 libre (3).
- Los auto anticuerpos circulantes del T3 y los inhibidores de enlace con la hormona pueden producir interferencias (4).
- Se ha conocido que la heparina tiene efectos in vivo e in vitro sobre la concentración de T3 libre (5). Por lo tanto, no obtener muestras en las cuales se haya utilizado este anti-coagulante
- En varias enfermedades no tiroideas (NIT), la evaluación de la condición de la tiroides se dificulta demasiado. Se recomienda tomar medidas TSH para identificar la disfunción de la tiroides.
- Las condiciones disalbuminémicas familiares pueden producir resultados erróneos en ensayos directos de T3 libre

“NO DEBE UTILIZARSE ESTE PROCEDIMIENTO PARA TAMIZACIÓN DE NEONATOS”

RANGOS Y VALORES ESPERADOS

Se realizó un estudio de la población adulta eutiroides para determinar, los valores esperados para la aplicación del método fT3 AccuLite CLIA. En la tabla 1 se presentan valores de media (R), desviación estándar (σ) y rangos esperados ($\pm 2\sigma$).

	Adultos (110 muestras)	Mujeres embarazadas (75 muestras)
Media (x)	2.8	3.0
Desviación estándar (σ)	0.7	0.6
rangos esperados ($\pm 2\sigma$)	1.4 – 4.2	1.8 – 4.2

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de un rango de valores que pueda esperarse de un método en particular para una población de personas “normales”, dependerá de una serie de factores como son: especificidad del método, población sometida a prueba y precisión del método que utilice el analista. Por estas razones, cada laboratorio deberá utilizar el rango de valores esperados establecido por el fabricante, tan solo hasta cuando se puede establecer un rango dentro de la institución por parte de los analistas que utilicen el método con la población propia del área en la cual este ubicado el laboratorio.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

A. Precisión

La precisión inter e intra del método fT3 AccuLite CLIA se determino mediante análisis en tres niveles distintos del pool de sueros de control. El número(N), valor medio(X), desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación (C.V) para cada uno de estos sueros controles son presentados en la Tabla 2 y Tabla 3.

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	20	2.00	0.18	9.0%
Normal	20	4.75	0.28	5.9%
Alto	20	8.24	0.54	6.6%

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	10	2.11	0.22	10.4%
Normal	10	4.99	0.41	8.2%
Alto	10	8.06	0.70	8.7%

* De acuerdo con la medición realizada en 10 experimentos en duplicado en un periodo de 10 días.

B. Exactitud

El método fT3 AccuLite CLIA se comparo con un método de inmunoensayo enzimático por microplacas (EIA). Se utilizaron muestras biológicas provenientes de poblaciones hipotiroideas, eutiroides, e hipertiroideas. Los valores estuvieron en un rango de 0.1pg/ml – 17pg/ml. El número total de muestras fue de 181. La ecuación de regresión de mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación se calcularon para este fT3 CIA en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos se observan en la tabla 4.

Método	Media (x)	Análisis de regresión de mínimos cuadrados	Coeficiente de correlación
Este Método	3.1	$Y=0.11+0.976(x)$	0.985
Referencia	3.2		

Se indican tan solo ligeras cantidades de sesgos entre el método y el de referencia mediante el acercamiento de los valores medios. La ecuación de regresión de mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación indica que existe un perfecto acuerdo entre los métodos.

C. Sensibilidad

Este procedimiento tiene una sensibilidad de 0.04pg/ml. Se evaluó la sensibilidad determinando la variabilidad del calibrador de suero 0 pg/ml y utilizando el valor estadístico de 2σ (95% de certidumbre) para calcular la dosis mínima.

D. Especificidad

La reactividad cruzada del anticuerpo Triyodotironina para sustancias seleccionadas se evaluó mediante la adición de la sustancia de interferencia a una matriz de suero a diversas concentraciones. Se calculo la reactividad cruzada derivando una proporción entre la dosis de una sustancia de interferencia con respecto de la dosis de Triyodotironina necesaria para desplazar la misma cantidad del trazador.

Sustancia	Reacción cruzada	Concentración
Triyodotironina	1.0000	-----
Tiroxina	<0.0002	10 μ g/ml
Yodotiroxina	<0.0001	10 μ g/ml

Diyodotiroxina	<0.0001	10 μ g/ml
Diyodotironina	<0.0001	10 μ g/ml
Fenilbutazona	<0.0001	10 μ g/ml
Salicilato sódico	<0.0001	10 μ g/ml

REFERENCIAS

- Pederson, K.O. Scand. J. Clin. Lab Invest. **34**, 247 (1974).
- Wild, D., *Immunoassay Handbook*, Stockton Press **p339** (1994).
- Wenzel, K.W., *Metabolism* **30**, 717 (1981).
- Bhagat, C., et al., *Clin Chem*, **29**, 1324 (1983).
- Lundberg, P.R., et al., *Clin Chem*, **28**, 1241 (1982).
- Melmed, S. et al., *J Clin Endocrinol Metab*, **54**, 300 (1982).
- Lalloz M.R., et al., *Clin Endocrinol*, **18**, 11 (1983).
- Verheezke P., "Free triiodothyronine concentrations in serum of 1050 euthyroid children is inversely related to their age." *Clin Chem*, **43:6**, 963-967 (1997).
- Mak YT, Chen EL, Chan A, Woo J and Swaminathan R, "Free triiodothyronine in sera of acutely ill general medical patients: a prognostic indicator," *Clin Chem*, **38**, 414 (1992).
- John R, Henley R and Shankland D, "Concentrations of free thyroxine and free triiodothyronine in sera of patients with thyroxine and triiodothyronine-binding autoantibodies," *Clin Chem* **36**, 470-473 (1990).

Revisión: 3 Fecha: 112210

Cat. #: 1375-300

For Orders and Inquiries, please contact

Tel: 949-951-2665

Fax: 949-951-3539

Email: info@monobind.com

On the Web: www.monobind.com

Please visit our website to learn more about our other interesting products and services.

EC REP CEpartner4U, 3951 DB; 13.NL
Tel: +31 (0) 6-516.536.26

Instrumentos y aplicaciones

Los productos de inmunoensayo de Monobind están diseñados para que funcionen en ambientes de laboratorios manuales y automatizados. AccuBind y Acculite son compatibles cualquier instrumentación de extremo abierto incluyendo analizadores químicos, lectores de microplacas y lavadores de microplacas. Es posible que exista o no un desarrollo de aplicación para su instrumento en particular, para estos casos, se recomienda visitar la sección de instrumentos de nuestro sitio en la web o comunicarse con techsupport@monobind.com

Monobind ofrece diversos instrumentos, incluyendo el lector de placa Impulse 2, el luminómetro CLIA diseñado para ser utilizado simultáneamente con nuestros productos y capaz de una calibración de dos puntos. Visitar nuestro sitio en la web para obtener mayor información.