

Alteraciones citogenómicas en pacientes pediátricos cubanos con leucemia linfoblástica aguda de células B

Cytogenomic alterations in Cuban pediatric patients with B cell acute lymphoblastic leukemia

Gustavo Barroso Sánchez* <https://orcid.org/0000-0001-9571-2729>

Lavaut Sánchez Kalia¹ <https://orcid.org/0000-0001-6906-2259>

Garrote Santana Heydis¹ <https://orcid.org/0000-0002-8449-1278>

¹ Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba

*Autor por correspondencia: gustavohem92@gmail.com

RESUMEN

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda de células B es la neoplasia que afecta con mayor frecuencia a la edad pediátrica. Las alteraciones citogenéticas y moleculares constituyen importantes biomarcadores pronósticos que sustentan la estratificación de riesgo al diagnóstico y el esquema más adecuado de tratamiento.

Objetivo: Evaluar los biomarcadores citogenéticos y moleculares en pacientes pediátricos cubanos con leucemia linfoblástica aguda de células B.

Métodos: Se realizó una investigación analítica, retrospectiva, longitudinal y multicéntrica en el período comprendido entre enero de 2012 y diciembre del 2020. El universo se constituyó por 125 pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda y se tomó una muestra de 84 pacientes, los cuales recibieron tratamiento en cuatro centros oncohematológicos del país.

Resultados: El análisis de las alteraciones numéricas demostró un predominio de los pacientes que presentaron hiperdiploidía alta. El estudio molecular evidenció que la mutación ETV6-RUNX1 fue la más frecuente (28,6 %). La edad, el sexo y el color de piel no se asociaron a los biomarcadores evaluados. El gen BCR-ABL se relacionó con variables de respuesta morfológica al tratamiento de inducción ($p=0,04$). La hipodiploidía y la $t(9;22)/BCR-ABL$ constituyeron variables predictoras de supervivencia global y libre de enfermedad, respectivamente.

Conclusiones: La evaluación de biomarcadores citogenéticos y moleculares en la leucemia linfoblástica aguda de células B es un pilar fundamental en la aplicación de protocolos de tratamiento adaptados al riesgo como parte del desarrollo de la medicina personalizada en el país.

Palabras clave: leucemia linfoblástica aguda; biomarcadores citogenéticos; biomarcadores moleculares; pronóstico.

ABSTRACT

Introduction: B-cell acute lymphoblastic leukemia is the neoplasm that most frequently affects children. Cytogenetic and molecular alterations are important prognostic biomarkers that support risk stratification at diagnosis and the most appropriate treatment scheme.

Objective: To characterize the cytogenetic and molecular biomarkers in Cuban pediatric patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia.

Methods: An observational, retrospective, multicenter cohort study was conducted between January 2012 and December 2020. A sample of 84 patients was taken from the universe of Cuban pediatric patients diagnosed with B-ALL, who received treatment at four oncohematological centers in the country.

Results: The analysis of numerical alterations showed a predominance of patients with high hyperdiploidy. The molecular study showed that the ETV6-RUNX1 mutation was the most frequent in 28.6 %. Age, sex, and skin color were not associated with the biomarkers evaluated. The BCR-ABL gene was related to morphological response variables to induction therapy ($p=0.04$). Hypodiploidy and $t(9; 22)/BCR-ABL$ were predictors of survival.

Conclusions: The evaluation of cytogenetic and molecular biomarkers in B-cell acute lymphoblastic leukemia is a fundamental pillar in the application of risk-adapted treatment protocols as part of the development of personalized medicine in the country.

Keywords: cell acute lymphoblastic leukemia; cytogenetic biomarkers; molecular biomarkers; prognosis.

Recibido: 02/12/23

Aceptado: 04/06/24

Introducción

La leucemia aguda linfoblástica de células B (LLAB) es un trastorno linfoproliferativo clonal que compromete fundamentalmente la médula ósea y se manifiesta a través de diferentes grados de falla medular e infiltración

extramedular. Constituye la neoplasia infantil más común y se corresponde aproximadamente al 25-30 % de los diagnósticos de cáncer en menores de 15 años y al 75 % de los casos de leucemia infantil.⁽¹⁾ Cuba presenta una incidencia anual de 2 casos por cada 100 000 niños y un promedio de 50 nuevos pacientes.⁽²⁾

Esta enfermedad constituye un importante problema de salud pública dada la morbilidad que genera por la irrupción del entorno psicosocial y familiar del paciente, los efectos secundarios al tratamiento, las recaídas, la probabilidad incrementada de sufrir una segunda neoplasia y el alto riesgo de mortalidad.⁽³⁾

Como parte de las estrategias para mitigar este impacto negativo y tratar de manera más efectiva la enfermedad, Cuba se incluyó desde hace varios años en el grupo cooperativo BFM (Berlín, Frankfurt, Munster), en su rama intercontinental, lo que permitió optimizar el tratamiento de los pacientes y mantener la retroalimentación sobre los resultados. Para desarrollar este protocolo terapéutico fue necesario introducir diferentes técnicas citogenéticas y moleculares para detectar alteraciones citogenómicas de impacto en el pronóstico y en la terapia adaptada al riesgo en estos pacientes.

El Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) constituye el centro de referencia para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad; pero las características citogenómicas de los pacientes y su valor predictivo de supervivencia se desconocen, por lo que se propone como objetivo evaluar los biomarcadores citogenéticos y moleculares en pacientes pediátricos cubanos con leucemia linfoblástica aguda de células B.

Métodos

Se realizó una investigación analítica, longitudinal, retrospectiva y multicéntrica, en el período comprendido entre enero de 2012 y diciembre de 2020. El universo

estuvo constituido por 125 pacientes con diagnóstico de LLA. Se tomó una muestra de 84 pacientes que recibieron tratamiento en cuatro centros oncohematológicos; con edades comprendidas entre 1 a 18 años de edad, con diagnóstico de LLA a partir de criterios inmunológicos y citogenéticos-moleculares. Se excluyeron aquellos pacientes en los que no fue posible completar la información necesaria para formar parte de la investigación.

Procedimientos

La tipificación de la LLA al inicio de la enfermedad se realizó mediante la clasificación morfológica, inmunofenotípica, citogenética y molecular. A los pacientes se les aplicó el protocolo de diagnóstico y tratamiento para LLA, ALLIC-BFM 2009, que incluye interrogatorio, examen físico y estudios complementarios de laboratorio y la estrategia terapéutica basada en poliquimioterapia intensiva. Los procedimientos para el análisis de los biomarcadores citogenómicos se exponen a continuación:

Citogenética convencional por técnica banda G: Las muestras de médula ósea (MO) fueron procesadas en cultivo de 24 horas. Se obtuvieron de 1 a 2 mL de MO mediante aspirado medular que se añadió a un frasco con medio de cultivo RPMI 1640, suero fetal bovino y heparina. La división celular se detuvo con colcemid. Posteriormente se cosechó con solución hipotónica de KCl (0.56g/100mL) y se fijó con una mezcla 3:1 de metanol y ácido acético glacial (dos lavados) y una mezcla 2:1 de metanol y ácido acético glacial (dos lavados posteriores), se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Se realizó la extensión de las láminas para el tratamiento con tripsina y tinción con Giemsa para la obtención de bandas. Se analizaron 20 metafases por paciente. La nomenclatura usada para la descripción de las

alteraciones cromosómicas fue la determinada por el ISCN 2020 (siglas del inglés, *International System of Chromosome Nomenclature 2020*).

Hibridación in situ por fluorescencia (FISH): Todas las muestras fueron cultivadas con la técnica de citogenética convencional. Las láminas (debidamente identificadas) fueron sometidas a pretratamiento en solución 2XSSC (NaCl/citrato de sodio) a 37°C. Posteriormente fueron deshidratadas mediante lavados sucesivos en diluciones etanólicas. A cada lámina se le aplicaron 10 µL de sonda (ETV6/RUNX1 o MLL-AF4), se colocó un cubreobjeto y fueron ubicadas en un sistema de desnaturalización e hibridación de ADN (S-96 *Quanta Biotech, qCycler*). Se realizó la codesnaturalización a 72°C durante 2 min, seguido de la hibridación en cámara húmeda a 37°C durante toda la noche, por 18 horas. Al día siguiente se retiró el cubreobjeto y se realizaron dos lavados para eliminar la hibridación excedente. Se utilizó la tinción de contraste DAPI (diamidinofenilindol) para la identificación de los núcleos celulares en interfase.

Las señales de hibridación se analizaron en un microscopio de fluorescencia OLYMPUSBX51. Los núcleos donde el marcaje era evidente fueron seleccionados para el conteo de las señales. En cada muestra fueron analizados 200 núcleos. Se consideró positivo el resultado cuando la alteración cromosómica estuvo presente en más del 10 % de los núcleos observados, según bibliografía consultada. Para la captura y procesamiento de imágenes se utilizó el Programa *Olympus MicroDP-BSW*. De cada imagen tomada se guardó una versión, como evidencia del marcaje real en los núcleos. Los resultados fueron expresados de acuerdo con la nomenclatura ISCN 2020.

Análisis de biomarcadores moleculares al diagnóstico

Se recogió un volumen de 5 a 8 mL de sangre medular anticoagulada con EDTA para extraer el ácido ribonucleico (ARN) mediante el kit reactivo *QIAamp RNA Blood Mini Kit*.⁽¹⁾ Se seleccionaron las muestras que presentaban una concentración de

ARN entre 70 y 200 ng/ μ L y un cociente de A260/A280 entre 1,7 y 2,1 comprobado a través del equipo espectrofotómetro de microgotas EPOCH (BioTek, EEUU).

Posteriormente se obtuvo ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) mediante una reacción de reverso transcripción. Con este material se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) de punto final, con igual protocolo de amplificación, pero con los cebadores específicos para el gen de fusión ETV6-RUNX1, BCR-ABL, TCF3-PBX1 o MLL-AF4, respectivamente.⁽²⁾ El análisis del producto de la PCR se realizó mediante electroforesis capilar y se expresó como positivo o negativo.

Recolección de los datos

Los datos para la investigación se obtuvieron de las historias clínicas de cada paciente, de los registros de los laboratorios de Inmunología, Citogenética y Biología Molecular del IHI y del registro de cáncer del centro. Toda la información se organizó y almacenó en una base de datos, con el empleo del programa estadístico SPSS (paquete estadístico para ciencias sociales, por sus siglas en inglés) versión 25.0 para Windows.

Procesamiento y análisis de la información

El análisis estadístico comenzó por la caracterización de la población de estudio, lo que implicó la descripción de todas las variables y la obtención de las frecuencias absolutas y relativas (porcentajes) de las distintas categorías.

La probabilidad de supervivencia fue estimada por el método de Kaplan–Meier y las diferencias en la distribución de las curvas de supervivencia se evaluaron mediante la prueba de log-rank. Se consideró como supervivencia global (SG) el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta la muerte del paciente o fecha de última consulta y como supervivencia libre de enfermedad (SLE) el tiempo transcurrido desde la fecha de la remisión hasta la fecha de recaída. Para validar

los resultados en términos de significación se consideró significativo todo valor de $p < 0,05$ para el estadígrafo asociado a la prueba.

Aspectos éticos

Para realizar esta investigación se contó con la aprobación del Consejo Científico y el Comité de Ética de la Investigación de la institución. Se tomaron en cuenta los principios referentes al código de ética de acuerdo con la declaración de Helsinki.⁽⁴⁾

Resultados

En la figura 1 se muestran las alteraciones detectadas en los pacientes con LLAB. Existió predominio de aquellos en los que no se evidenciaron las aberraciones numéricas y estructurales como parte del protocolo diagnóstico, para un 51%, seguido de 29 % que representó la t(12;21)/ETV6-RUNX1.

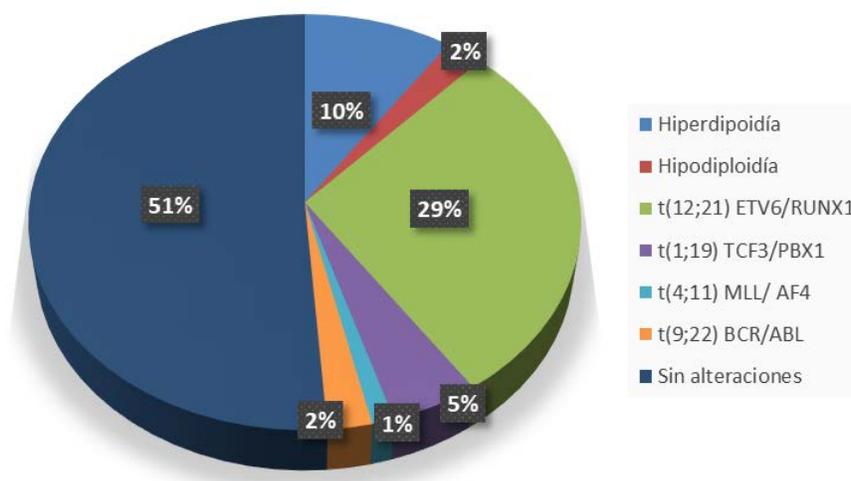


Fig. 1- Frecuencia de los biomarcadores en la población de estudio.

En la tabla 1 se observa la probabilidad de supervivencia de los pacientes de acuerdo a la presencia o no de los biomarcadores. Se constató un mayor impacto de las alteraciones de alto riesgo t(9;22) BCR-ABL y la hipodiploidía tanto en la SG como en la SLE respectivamente.

Tabla 1- Supervivencia de los pacientes de acuerdo al biomarcador

Biomarcador	Mediana SLE años (IC 95 %)	p	Mediana SG años (IC 95 %)	P
Hiperdiploidía				
Presente	6,21 (4,58-7,85)	0,867	5,60 (3,71-7,50)	0,393
Ausente	6,89 (5,89-7,89)		7,48 (6,53-8,44)	
Hipodiploidía				
Presente	1,16 (0,00-3,34)	0,006	1,68 (0,00-4,88)	0,003
Ausente	6,94 (6,00-7,89)		7,47 (6,55-8,38)	
t(12;21) ETV6-RUNX1				
Mutado	7,06 (5,36-8,77)	0,704	8,41 (6,94-9,88)	0,106
No mutado	6,10 (5,13-7,06)		6,25 (5,29-7,21)	
t(4;11) MLL-AF4				
Mutado	2,18 (2,18 -2,18)	0,212	2,56 (2,56-2,56)	0,169
No mutado	6,86 (5,92-7,81)		7,39 (6,47-8,30)	
t(9;22) BCR-ABL				
Mutado	3,32 (0,00-9,22)	0,084	3,32 (0,00-9,22)	0,027
No mutado	6,94 (5,99-7,89)		7,47 (6,56-8,39)	
t (1;19) TCF3-PBX1				
Mutado	4,91 (2,28-7,54)	0,723	4,91 (2,28-7,54)	0,919
No mutado	6,77 (5,80-7,73)		7,31 (6,38-8,24)	

En la figura 2 se observa la SG y SLE de toda la serie de acuerdo al biomarcador. Se evidenció una mayor probabilidad de SG para los pacientes con hiperdiploidía (p=0,007) y de SLE para aquellos positivos a la t(12;21) ETV6-RUNX1 (p=0,009).

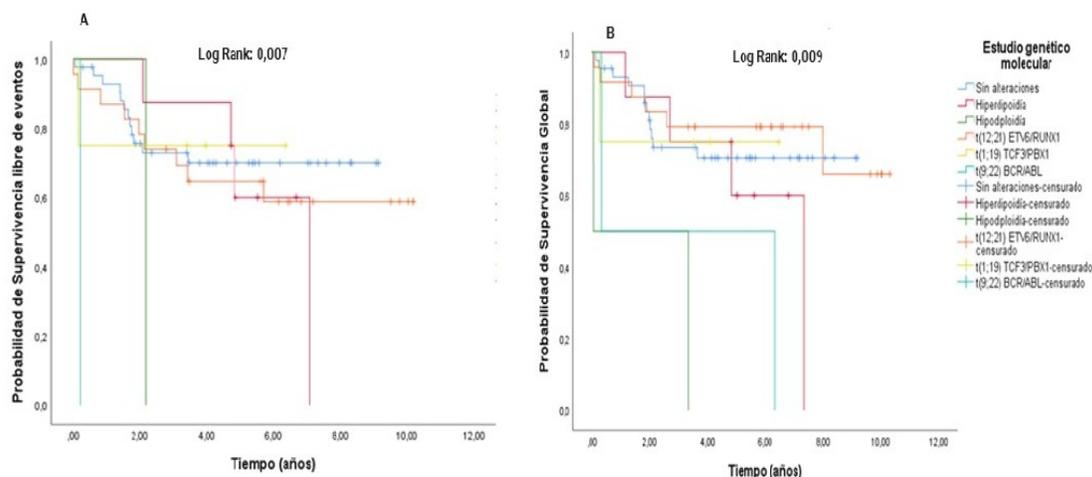


Fig. 2- Supervivencia de toda la serie de acuerdo al biomarcador.

A: Supervivencia libre de eventos. B: Supervivencia Global

Discusión

La LLA pediátrica proporciona un modelo para mejorar la supervivencia entre los pacientes con cáncer, a partir de mejoras progresivas en la eficacia de los regímenes de quimioterapia con múltiples agentes y la estratificación de la intensidad del tratamiento según a las características clínicas del paciente, las características biológicas de las células leucémicas, y la respuesta temprana al tratamiento, todos los cuales son predictivos del riesgo de recaída. En conjunto, estos avances han aumentado la tasa de supervivencia de menos del 10 % en la década de 1960, a 90 % en la actualidad en países desarrollados.⁽⁵⁾

Cuando se toman decisiones sobre la intensidad de la quimioterapia y la selección de pacientes en primera remisión, se consideran los factores que predicen una mayor o menor posibilidad de curación. Los principales factores pronósticos incluyen las características clínicas presentes en el momento del diagnóstico, características biológicas y genéticas de las células leucémicas y la respuesta temprana al tratamiento.

La expresión en la superficie celular y citoplasmática de marcadores de linaje (inmunofenotipo) clasifica LLA infantil en células B precursoras (85 %) o células T (15 %). Además, se plantea que la supervivencia entre los niños con LLA de células T es inferior a la de los niños con LLA de células B, aunque con el uso más intensivo de la quimioterapia, esta diferencia se reduce de manera significativa.⁽⁶⁾

La LLA puede ser de precursor de células B o de linaje de células T. En el 25 al 30 % de los niños con LLA de células B, las células leucémicas tienen hiperdiploidía alta (>50 cromosomas) debido a ganancias no aleatorias de cromosomas, este subtipo se asocia a un excelente pronóstico. La hipodiploidía (<44 cromosomas) ocurre en 2 a 3 % de los niños con LLA de células B y es un fuerte factor pronóstico negativo.⁽⁷⁾

De los subtipos caracterizados por translocaciones, el más común en la LLA-B infantil es t(12;21)(p13;q22) codifica ETV6-RUNX1, que suele ser crítico en análisis citogenético y se asocia con favorable pronóstico.^(8,9) En las alteraciones detectadas en los pacientes de la presente serie existió predominio de aquellos en los que no se evidenciaron las aberraciones numéricas y estructurales como parte del protocolo diagnóstico, seguido de la t(12;21)/ETV6-RUNX1. Al analizar la SG y la SLE de toda la serie de acuerdo al biomarcador se evidenció mayor probabilidad de SG para los pacientes con hiperdiploidía y para aquellos positivos a la t(12;21) ETV6-RUNX1.

El panorama genómico de la LLAB se caracteriza por una serie de alteraciones genómicas que interrumpen el desarrollo normal de las células B y, en algunos casos, por mutaciones en los genes que proporcionan una señal de proliferación (por ejemplo, mutaciones activadoras en los genes de la familia *RAS* o mutaciones y translocaciones que producen señalización mediante una vía de cinasa). Las alteraciones genómicas que conducen a la interrupción del desarrollo de las células B son, entre otras, translocaciones (por ejemplo, *TCF3-PBX1* y *ETV6-RUNX1*),

mutaciones puntuales (por ejemplo, en *IKZF1* y *PAX5*), y deleciones intragénicas o intergénicas (por ejemplo, de *IKZF1*, *PAX5*, *EBF* y *ERG*).⁽¹⁰⁾

Las alteraciones genómicas de la LLA de células B precursoras tienden a presentarse en patrones que no se ajustan al azar, más bien se agrupan en subtipos que se delimitan por sus características biológicas, como los perfiles de expresión génica. Los casos con translocaciones cromosómicas recurrentes (por ejemplo, *TCF3-PBX1* y *ETV6-RUNX1*, y la LLA con reordenamiento de *MLL [KMT2A]*) tienen características biológicas distintivas.^(8,9)

En relación con la probabilidad de supervivencia de los pacientes de acuerdo a la presencia o no de los biomarcadores, se constató un mayor impacto de las alteraciones de alto riesgo t(9;22) BCR-ABL y la hipodiploidía tanto en la SG como en la SLE respectivamente. La mayoría de pacientes con hipodiploidía se ubican en los grupos casi haploide y de hipodiploidía baja; estos dos grupos tienen un aumento del riesgo de fracaso del tratamiento en comparación con los casos sin hipodiploidía. En varios estudios se demostró que los pacientes de enfermedad residual mínima (ERM) alta ($\geq 0,01$ %) después de la inducción tienen un pronóstico muy precario, con tasas de supervivencia sin complicaciones (SSC) a 5 años que oscilan entre 25 y 47 %. Aunque a los pacientes con hipodiploidía que presentan una enfermedad residual medible baja después de la inducción les va mejor (SLE a 5 años, 64–75 %), sus desenlaces son inferiores a los de la mayoría de niños con otro tipo de LLA.⁽¹¹⁾

El cromosoma Filadelfia es una translocación entre el oncogén *ABL-1* (en el brazo largo del cromosoma 9) y el gen *BCR* de la región de ruptura (en el brazo largo del cromosoma 22), que produce el gen de fusión *BCR-ABL1*. El *BCR-ABL1* codifica una proteína oncogénica con actividad de tirosina cinasa. Este subtipo de LLA es más común en niños mayores con LLA de células B precursoras y con recuento de

leucocitos alto; la incidencia de la t(9;22)(q34;q11,2) aumenta a cerca de 25 % en adultos jóvenes con LLA.^(8, 9)

La proporción de niños con LLA curada con éxito ha aumentado progresivamente con el tiempo; el uso de la combinación de quimioterapia moderna ha dado como resultado una remisión a largo plazo en casi el 80-90 % de los niños diagnosticados con LLA. Lo anterior se refiere a países de altos ingresos, porque en países de bajos a medianos ingresos como el nuestro, estas cifras todavía se mantienen por debajo. De hecho, el estudio CONCORD-2 resalta que la supervivencia a 5 años a nivel mundial es muy variable; durante 1995-1999, el rango va desde 10,6 % en registros de China, hasta 86,8 % en Austria; y entre 2005-2009, va desde 52,4 % (Cali, Colombia) hasta 91,6 en Alemania.⁽¹²⁾ En Cuba, la estratificación de riesgo se ha optimizado durante el paso de los años; sin embargo, los resultados alcanzados en base a SLE y SVG aún pueden perfeccionarse.⁽²⁾

La evaluación de biomarcadores citogenéticos y moleculares en LLAB es un pilar fundamental en la aplicación de protocolos de tratamiento adaptados al riesgo como parte del desarrollo de la medicina personalizada en el país.

Referencias bibliográficas

1. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2020;105(11):2524-39. <https://doi:10.3324/haematol.2020.247031>.
2. Machín-García S, Leblanch-Fernández C, García-Carabaloso M, Escalona-Vives Y, Álvarez-Molina I, Plá Del Toro MJ, *et al*. Caracterización de las leucemias en niños en Cuba (2006-2015). *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2020 [citado 19/01/23]; 36(1):e1103. Disponible en: <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1103>
3. Pui CH. Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. *Front Med*. 2020;14(6):689-700. <https://doi:10.1007/s11684-020-0759-8>.

4. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA. 2013 Nov 27;310(20):2191-4. <https://doi:10.1001/jama.2013.281053>.
5. Inaba H, Pui CH. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Med. 2021;10(9):1926. <https://doi:10.3390/jcm10091926>.
6. Li W. Flow Cytometry in the Diagnosis of Leukemias. In: Li W, ed. Leukemia. Brisbane: Exon Publications; 2022. DOI:[10.36255/exon-publications-leukemia-flow-cytometry](https://doi.org/10.36255/exon-publications-leukemia-flow-cytometry)
7. Lejman M, Chałupnik A, Chilimoniuk Z, Dobosz M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Int J Mol Sci. 2022;23(5):2755. <https://doi:10.3390/ijms23052755>.
8. Brown G. Oncogenes and the origins of leukemias. Int J Mol Sci. 2022;23(4):2293. <https://doi:10.3390/ijms23042293>.
9. Huang FL, Liao EC, Li CL, Yen CY, Yu SJ. Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments. Oncol Lett. 2020;20(1):448-454. <https://doi:10.3892/ol.2020.11583>.
10. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2024 Aug 28. In: PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002–. [citado 19/03/24]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>
11. Radu LE, Colita A, Pasca S, Tomuleasa C, Popa C, Serban C, et al. Day 15 and Day 33 Minimal Residual Disease Assessment for Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated According to the BFM ALL IC 2009 Protocol: Single-Center Experience of 133 Cases. Front Oncol. 2020;10:923. <https://doi:10.3389/fonc.2020.00923>.

12. Bonaventure A, Harewood R, Stiller CA, Gatta G, Clavel J, Stefan DC, *et al.* Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995–2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. *Lancet Haematol.* 2017;4(5):e202–17. doi: [10.1016/S2352-3026\(17\)30052-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30052-2)

Conflictos de interés

Los autores no declaran conflictos de interés.

Contribución de autoría

Conceptualización: Gustavo Barroso Sánchez

Curación de datos: Gustavo Barroso Sánchez, Kalia Lavaut Sánchez

Análisis formal: Gustavo Barroso Sánchez, Heydis Garrote Santana

Investigación: Gustavo Barroso Sánchez

Metodología: Dr. Gustavo Barroso Sánchez, DraC. Heydis Garrote Santana

Administración del proyecto: Dr. Gustavo Barroso Sánchez

Supervisión: Heydis Garrote Santana

Validación: Gustavo Barroso Sánchez, Kalia Lavaut Sánchez

Visualización: Gustavo Barroso Sánchez

Redacción – borrador original: Gustavo Barroso Sánchez, Kalia Lavaut Sánchez

Redacción – revisión y edición: Gustavo Barroso Sánchez, Heydis Garrote Santana