

Funcionalidad plaquetaria del plasma rico en plaquetas autólogo con el uso de epinefrina como agonista

Platelet functionality of autologous platelet-rich plasma with the use of epinephrine as an agonist

Lidyce Quesada-Leyva^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-4250-0164>

Gerardo Brunet-Bernal¹ <https://orcid.org/0000-0002-9302-3054>

Ever Quintana-Verdecia¹ <https://orcid.org/0000-0003-1305-1643>

Mayelin Hernández-Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0003-0770-058X>

Millelys Castro-Consuegra¹ <https://orcid.org/0000-0001-8443-3900>

Zaddys Ahimara Ruiz-Hunt¹ <https://orcid.org/0000-0002-2097-7711>

¹ Universidad de Ciencias Médicas Camagüey. Centro de Inmunología y Productos Biológicos. Camagüey, Cuba.

*Autor para la correspondencia (email): lidyce.cmw@infomed.sld.cu.

RESUMEN

Introducción: La Agregometría por transmisión de luz es una técnica de laboratorio que se aplica para medir la agregación de plaquetas en suspensión en cualquier plasma y medir la agregación de las plaquetas que es detectada gracias a un sistema óptico de detección.

Objetivo: Determinar la funcionalidad plaquetaria mediante la agregación con epinefrina como agonista en muestras de plasma rico en plaqueta midiendo la densidad óptica.

Métodos: Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, para la agregación plaquetaria, se utilizó la epinefrina como agonistas, se midió la densidad óptica sobre muestras en sujetos aparentemente sanos, con rango normal de plaqueta ($150-450 \times 10^9/L$), durante tres días y tres temperaturas, la sustancia agregante fue la epinefrina con concentración $2,5 \times 10^{-5}$ M de manera cuantitativa.

Resultados: Las medias de la densidad óptica en la agregación plaquetaria inducida por epinefrina como agonista en tres tiempos y tres temperaturas, arrojaron diferencias significativas ($p= 0,02-0,05$), donde no se empleó el agonista la significación fue mayor de 0,05.

Conclusiones: Se evidenció la funcionalidad del plasma rico en plaquetas autólogo con un estudio de agregación plaquetaria, estos resultados permitieron tener una visión completa y general sobre la funcionabilidad del producto final.

DeCS: AGREGACIÓN PLAQUETARIA; PLASMA RICO EN PLAQUETAS; EPINEFRINA; RECEPTORES ADRENÉRGICOS; PRUEBAS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA.

ABSTRACT

Introduction: Light transmission aggregometry consists of adding an agonist to the patient's platelet-rich plasma and measuring the aggregation of platelets, which is detected thanks to an optical detection system.

Objective: To determine platelet functionality through aggregation with epinephrine as an agonist in platelet-rich plasma samples by measuring optical density.

Methods: A descriptive cross-sectional study was carried out. For platelet aggregation, epinephrine was used as an agonist. The optical density was measured on samples in apparently healthy subjects with a normal platelet range (150-450 X10⁹/L) for three days and three temperatures. The aggregating substance was epinephrine, with a concentration of 2.5 x 10⁻⁵ M quantitatively.

Results: The average optical density in platelet aggregation induced by epinephrine as an agonist at three times and three temperatures showed significant differences (p=0.02-0.05). Where the agonist was not used, the significance was greater than 0.05.

Conclusions: The functionality of autologous platelet-rich plasma was evidenced with a platelet aggregation study; these results allowed us to have a complete and general vision of the functionality of the final product.

DeCS: PLATELET AGGREGATION; PLATELET-RICH PLASMA; EPINEPHRINE; RECEPTORS, ADRENERGIC; PLATELET FUNCTION TESTS.

Recibido: 27/08/24

Aprobado: 03/01/2025

Ronda: 1

INTRODUCCIÓN

Una de las pruebas utilizadas en la evaluación de la función plaquetaria es la agregometría por transmisión de luz. En 1962 Born y Cross,⁽¹⁾ desarrollan un método turbidimétrico para la medición de la agregación, donde se simulan las condiciones fisiológicas, pruebas de función plaquetaria,

<http://revistaamc.sld.cu/>

la fisiología de la adhesión y agregación, de forma que permiten la cuantificación de la respuesta plaquetaria y la identificación de una función anormal.

En consecuencia, la técnica se basa en la medición por espectrofotometría del cambio turbidimétrico que se produce a medida que las plaquetas se agregan ante el estímulo de un agonista o sustancia proagregante. Lo que promueve la activación de algunos factores de la coagulación que incluyen la protrombina y el factor X, los cuales liberan inhibidores de la fibrinólisis y retrasan la destrucción de las mallas de fibrina por las enzimas fibrinolíticas.(2,3)

A través de la adhesión al endotelio vascular cuando sufre algún tipo de lesión, para la formación del tapón y de la liberación de factores que participan en la cascada de la coagulación, las plaquetas están provistas de glicoproteínas de superficie que favorecen la formación del tapón hemostático, las cuales permiten la interacción con otras plaquetas y con el endotelio vascular.(2,4)

Cuando a una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP), se le adiciona un agonista, las plaquetas se agregan y la muestra se vuelve menos turbia, lo que permite mayor paso de luz y disminuye la densidad óptica. Como resultado se obtienen las curvas de agregación en función del tiempo y la señal es detectada por el espectrofotómetro.(4,5)

La agregometría por transmisión de luz sigue siendo la prueba de función plaquetaria de referencia para el diagnóstico clínico de los trastornos de la función plaquetaria. Esta técnica determina el porcentaje de agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas en respuesta a la adición de un agonista.(6,7)

Los agonistas comunes empleados en los análisis de la función plaquetaria incluyen: Adenosin difosfato (ADP), epinefrina, colágeno, ácido araquidónico, ristocetina y trombina.(8)

En general se han establecido correlaciones entre las respuestas de las plaquetas a cada uno de los agonistas y los defectos específicos en sus funciones. En la actualidad, no hay consenso en cómo el ensayo de función plaquetaria, debe ser llevado a cabo para evaluar a los pacientes. Cada institución sigue sus propias prácticas. No existen estándares unificados para la toma de muestra, procesamiento, desarrollo del ensayo, valores de referencia e interpretación de los resultados.(9,10,11)

A diferencia de otros exámenes de laboratorio que cuentan con procedimientos estandarizados, con rangos de referencia establecidos y ampliamente aceptados para interpretaciones diagnósticas, la agregación por transmisión de luz (ATL), aún no se ha logrado estandarizar pese a los esfuerzos realizados por organismos internacionales como la *International Society of Thrombosis and Hemostasis* (ISTH). Según Hayward et al.,⁽¹²⁾ los laboratorios clínicos deben determinar sus intervalos de referencia para el porcentaje de agregación máxima, específico para cada agonista evaluado, alcanzó 96 % de consenso entre los 45 laboratorios canadienses y de los Estados Unidos participantes en la elaboración de las Guías Norteamericanas sobre la materia publicadas en 2010.⁽¹²⁾

Esta recomendación se basa en dos aspectos: primero, la adecuada evaluación de los resultados de laboratorio es parte esencial en el proceso de decisión clínica y en segundo lugar; pero no menos importante, en el consenso existente entre expertos sobre la necesidad de que cada laboratorio clínico informe sus intervalos de referencia, pero la información sobre la metodología y el cálculo de estos en ATL es limitada.⁽¹³⁾

La posibilidad de utilizar un método para evaluar la agregación plaquetaria, constituye uno de los retos más importantes, ya que la técnica estima la cinética de la agregación de las plaquetas a través de la turbidimetría.

El objetivo de la investigación fue determinar la funcionalidad plaquetaria mediante la agregación con epinefrina como agonista en muestras de plasma rico en plaqueta midiendo, la densidad óptica en el Centro de Inmunología y Productos Biológicos de la Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal. La población objeto de estudio se constituyó por 30 sujetos aparentemente sanos de 19 años y más con rango normal de plaqueta ($150-450 \times 10^9/L$) de la Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey. Se empleó un muestreo no probabilístico e intencional para la selección de los sujetos. Se analizaron las variables concentración de epinefrina en PRP y la agregación plaquetaria mediante unidades de absorbancia relativa.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 726 g ($1\ 800\ rpm$),⁽¹⁴⁾ para la obtención de PRP autólogo concentraciones de plaquetas $>150-450 \times 10^9/L$. Los materiales para la realización de la agregación plaquetaria: Un ámpula de epinefrina, viales eppendorf 1,5 ml, microplacas ELISA, pipetas automáticas 10, 20, 200 μL , cronómetro, lector de microplacas 2100-C. Método de agregación según técnica de Born.⁽¹⁾

El estudio de la agregación plaquetaria está basado en el método turbidimétrico que revela la variación de la transmitancia que se obtiene del PRP después de la unión de la sustancia agonista (epinefrina 1mg/mL). Se trabajó con una microplaca de 96 pocillos, de la cual se emplearon 30 pocillos, se vertió 175 μL de PRP en cada pocillo, luego, se agregó a cada pocillo 25 μL de epinefrina con concentración $2,5 \times 10^{-5} M$. Se utilizaron tres muestras en los diferentes tiempos: (0, 1, 3 min), en tres días y a varias temperaturas (4 °C, 37 °C y -20 °C). El estudio se basó en la tecnología del lector de micro placas con densidad óptica.

El procesamiento y recolección de la información se realizó con los resultados de DO mediante espectrofotometría ultravioleta y visible a una longitud de onda de 530 nm. Para comparar las medias de las muestras en los tres tiempos, en cada uno de los días y para cada temperatura se empleó el test no paramétrico de Friedman.^(14,15) Los análisis se realizaron en SPSS v 26.0 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Se cumplieron con los principios de la Declaración de Helsinki para la investigación en seres humanos.⁽¹⁶⁾

RESULTADOS

La agregación plaquetaria inducida por la epinefrina como agonista se observó a, partir de las muestras con y sin el agonista en tres tiempos y para tres temperaturas. Las probabilidades asociadas al estadígrafo de Friedman para comparar las medias de la densidad óptica mostraron diferencias significativas para las muestras donde se empleó el agonista plaquetario, no así en aquellas donde no se empleó (Tabla 1).

Tabla 1 Densidad óptica de las muestras de plasma rico en plaquetas según temperatura, tiempos y presencia del agonista

Días	Agonista	Temperaturas																				
		37 °C							4 °C							-20 °C						
		Tiempo 0		1 min		3 min		(p) *	Tiempo 0		1 min		3 min		(p) *	Tiempo 0		1 min		3 min		(p) *
		X̄	DE	X̄	DE	X̄	DE		X̄	DE	X̄	DE	X̄	DE		X̄	DE	X̄	DE	X̄	DE	
1	No	0,6	0,11	0,6	0,12	0,6	0,14	0,06	0,6	0,17	0,6	0,18	0,6	0,16	0,09	0,6	0,16	0,6	0,17	0,5	0,17	0,08
	Sí	0,5	0,02	0,5	0,01	0,4	0,02	0,03	0,5	0,06	0,4	0,06	0,3	0,05	0,05	0,4	0,01	0,4	0,02	0,3	0,02	0,05
2	No	0,5	0,11	0,5	0,11	0,5	0,11	0,72	0,5	0,10	0,5	0,10	0,5	0,12	0,44	0,5	0,11	0,5	0,11	0,5	0,11	0,49
	Sí	0,5	0,03	0,5	0,03	0,4	0,03	0,02	0,6	0,02	0,5	0,03	0,5	0,02	0,05	0,6	0,02	0,6	0,02	0,5	0,02	0,06
3	No	0,7	0,02	0,7	0,03	0,7	0,02	0,37	0,7	0,03	0,7	0,02	0,7	0,02	0,26	0,7	0,04	0,7	0,04	0,7	0,05	0,15
	Sí	0,5	0,07	0,5	0,06	0,4	0,06	0,04	0,6	0,02	0,5	0,02	0,5	0,01	0,04	0,6	0,03	0,6	0,03	0,5	0,02	0,05

*Significación estadística de la prueba de Friedman para comparar las muestras con uso o no de epinefrina para cada temperatura y en los tres tiempos.

DISCUSIÓN

En las investigaciones realizadas por Mesa et al.,⁽¹⁷⁾ reseñan que existen diversos factores que afectan la agregación plaquetaria como la temperatura, la lipemia, la toma de la muestra, el intervalo desde la venopunción y la preparación del PRP. En ese sentido Gómez et al.,⁽¹⁸⁾ describen que una vez que se le agrega un agonista plaquetario, como epinefrina, ADP, colágeno, ácido araquidónico, trombina y ristocetina estimulan la agregación y registra como una función de tiempo posterior a la adición del agonista.⁽¹⁷⁾

Del mismo modo abordan que a mayor agregación plaquetaria, mayor transmisión de la luz y viceversa. Estos cambios de luminiscencia o turbidez son el reflejo de la formación de agregados plaquetarios, derivados de microagregados.⁽¹⁸⁾ Estos resultados concuerdan con la investigación donde la agregación plaquetaria en el PRP con epinefrina como agonista permite el paso de la luz con una desviación estándar de 0,02 - 0,05.

Así como, Silva y D'Amico,⁽¹⁹⁾ plantean que, el método de turbidimetría se basa en promover la agregación de plaquetas en PRP utilizaron varios agonistas (ácido araquidónico, ADP, epinefrina y colágeno). La agregación resultante se mide a medida que la densidad óptica del PRP disminuye cuando las plaquetas se agregan.

La intensidad y velocidad de esta disminución están altamente relacionadas y dependen de la función plaquetaria.^(20,21)

De acuerdo con lo referido por Gómez et al.,⁽¹⁸⁾ la agregabilidad inducida por agonistas *in vitro* con epinefrina en diferentes condiciones de almacenamiento, provoca una respuesta en la función plaquetaria e inducen la agregación, estos resultados sugieren que las plaquetas mantienen su forma discoide y lo suficiente estable como para reaccionar con los agonistas.

En el estudio multicéntrico de Platton et al.,⁽²¹⁾ evalúan la agregación de plaquetas automatizada en los analizadores de coagulación de la serie Sysmex CS, establecen rangos de referencia y un régimen de prueba ideal, utilizan como agonistas ADP, ácido araquidónico, colágeno, ristocetina, epinefrina, la agregación máxima se alcanzó a los cinco minutos con ADP, colágeno, ristocetina, los demás agonistas requirieron 10 minutos.

Los resultados descritos por Platton et al.,⁽²²⁾ muestran diferencia con la investigación, donde se obtuvo la máxima agregación a los tres minutos con la epinefrina. Además, hace referencia que el resultado de la DO de cada muestra que se analizó está en dependencia del tiempo y concentración de plaquetas, aunque en las revisiones se sugiere tiempo de agregación de 10 minutos en dependencia del agonista.

En los agonistas las concentraciones y valores normales de la agregometría para la epinefrina es de 11×10^{-6} mol/L – $1,1 \times 10^{-6}$ mol/L, son patrones de referencia para el diagnóstico de múltiples trastornos funcionales plaquetarios primarios o adquiridos, se recomienda el uso de una concentración inicial de epinefrina de 5 μ M y de una dosis más alta en muestras alteradas. Se usan dosis bajas de epinefrina para la detección de dosis mínima que induce la agregación secundaria.^(11,22)

Las dosis de los agentes agregantes pueden variar en los diferentes centros. Las dosis estandarizadas son las siguientes:⁽¹¹⁾ La epinefrina, por lo regular, se utiliza en dos dosis, la dosis alta en concentración de $2,5 \times 10^{-5}$ y la dosis baja en concentración de $2,5 \times 10^{-6}$.

Al margen de los resultados descritos en la bibliografía se hace referencia a la epinefrina como agonista en el comportamiento de la agregación, que permite investigar los mecanismos de acción involucrados en este proceso, esto puede ayudar a comprender la fisiología y la regulación de la agregación plaquetaria, de esta se puede evaluar su capacidad para formar agregados.

CONCLUSIONES

Se comprobó la funcionalidad del PRP autólogo con un estudio de agregación plaquetaria con epinefrina, estos resultados permiten tener una visión completa y general sobre la funcionabilidad en el PRP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. J Physiol [Internet]. 1963 [citado 20 May 2024];168: 178-195. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1359417/pdf/jphysiol01214-0203.pdf>
2. Guevara Arismendi NM, Escobar Gallo GE, Campuzano Maya G. Clinical utility of platelet aggregometry. Med Labor [Internet]. 2012 [citado 20 May 2024];18(7-8):[about 21 p.]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2012/myl127-8b.pdf>
3. Malarczyk D, Odnoczek E. Light transmission aggregometry in the diagnosis of thrombocytopathy. J Tran Med [Internet]. 2023 [citado 20 May 2024];16(3):[about 21 p.]. Disponible en: https://journals.viamedica.pl/journal_of_transfusion_medicine/article/view/JTM.2023.0006/72696
4. Sachs UJ, Röder L, Cooper N, Radon Ch, Kolde HJ. Automated Light Transmission Aggregometry with and without Platelet Poor Plasma Reference: A Method Comparison. TH Open [Internet]. 2023 [citado 7 May 2024];7(1):[about 9 p.]. Disponible en: <https://www.thiemeconnect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-0043-1762588.pdf>
5. Denessen EJS, Van Den Kerkhof DL, Jeurissen MLJ, Wetzels RJH, Verhezen P WM, Henskens YMC. Determining the optimal storage time and temperature for performing platelet function assays and global hemostasis assays. Platelets [Internet]. 2022 [citado 7 May 2024];33(3):416-424. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09537104.2021.1934666?needAccess=true&role=button>
6. Lussana F, Femia EA, Pugliano M, Podda G, Razzari C, Maugeri N; et al. Evaluation of platelet function in essential thrombocythemia under different analytical conditions. Platelets [Internet]. 2020 [citado 7 May 2024];31(2):[about 8 p.]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09537104.2019.1584668>
7. Stépanian A, Fischer F, Flaujac C, Eschwège V, Delassasseigne C, Leflem L; et al. Light transmission aggregometry for platelet function testing: position paper on current recommendations and French proposals for accreditation. Platelets [Internet]. 2024[citado 6 Marz 2024];35(1):[about 25 p.]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39555668/>
8. Zhou Y, Yasumoto A, Lei C, Huang CJ, Kobayash H, Wu Y; et al. Classification of platelet aggregates by agonist type. BioRxiv [Internet]. 2019 [citado 22 May 2024];2(8) :[about 7 p.]. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/805408v2.full.pdf>
9. Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. Am J Clin Pathol [Internet]. 2005[citado 23 May 2024];123(2): 172-183. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15842039/>
10. Lussana F, Femia EA, Pugliano M, Podda G, Razzari C, Maugeri N; et al. Evaluation of platelet

function in essential thrombocythemia under different analytical conditions. Platelets [Internet]. 2020 [citado 8 May 2023];31(2):[about 4 p.]. Disponible en:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09537104.2019.1584668>

11. Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M. Advances in Platelet Function Testing—Light Transmission Aggregometry and Beyond. J Clin Med [Internet]. 2020 [citado 8 May 2023];9(8): [about 2 p.]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/8/2636>

12. Hayward C, Moffat K, Raby A, Israels S, Plumhoff E, Flynn G; et al. Development of North American Consensus Guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using Light Transmission Aggregometry. American Journal of Clinical Pathology [Internet]. 2010 [citado 28 May 2024]; 134 :[about 7 p.]. Available from:

<https://academic.oup.com/ajcp/article/134/6/955/1760860?login=false>

13. Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. J Thromb Haem [Internet]. 2008 [citado 8 May 2024];6(4):2. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1538783622105416>

14. Checa Rojas A. Método: Conversión de las fuerzas g (RCF) a revoluciones por minuto (rpm) y Equilibrio del rotor [Internet]. Estados Unidos: Conogasi.org; 2018 [citado 6 May 2024]. Disponible: <https://conogasi.org/articulos/metodo-conversion-de-las-fuerzas-g-rcf-a-revoluciones-por-minuto-rpm-y-equilibrio-del-rotor/>.

15. Sánchez Acero FA. Prueba Anova para datos no Paramétricos de Friedman en JASP [tesis]. Colombia: Fundación Universitaria Konrad Lorenz; 2020 [citado 10 julio 2024]. Disponible en: <https://repositorio.konradlorenz.edu.co/handle/001/2491>

16. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la AMM. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. Brasil: Asamblea General Fortaleza; 2013 [citado 20 May 2024]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/polices-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

17. Mesa González L, Castañeda Travieso M, Montero López M, Mojena López X, Ricardo Ricardo N, Jiménez Sosa M. Estudio de agregación plaquetaria con diferentes agonistas. Valores de referencia. Rev cuban med [Internet]. 2017 [citado 10 May 2024];56(1):[aprox. 5 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232017000100005

18. Gómez Gómez B, Rodríguez Weber FL, Díaz Greene EJ. Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. Med Interna Méx [Internet]. 2018 [citado 10 May 2024];34(2):[aprox. 3 p.]. Disponible en:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-48662018000200007&lng=es

<http://revistaamc.sld.cu/>

19. Silva LL da, D'Amico EA. Estudio comparativo entre agregación plaquetaria por turbidimetria e impedância elétrica em pacientes sob terapia antiplaquetária à base de ácido acetilsalicílico. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. 2010 [citado 10 May 2024];32(6): [aprox. 6 p.]. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/3bVg58kJvVMPG9LvRWrljGF/?format=pdf&lang=en>
20. Tsoupras A, Zabetakis I, Lordan R. Platelet aggregometry assay for evaluating the effects of platelet agonists and antiplatelet compounds on platelet function in vitro. MethodsX [Internet]. 2018 [citado 19 May 2024];26(6):[about 2 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6312786/>.
21. García Chávez J, Hernández Juárez J, Sánchez Jara B, García Lee MT, Rodríguez Castillejos C, Montiel Cervantes L; et al. Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la trombastenia de Glanzmann. Gac Méd Méx [Internet]. 2022 [citado 19 May 2024];158(spe4): [aprox. 5 p.]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132022001000001
22. Platton S, McCormick Á, Bukht M, Gurney D, Holding I, Moore GW. A multicenter study to evaluate automated platelet aggregometry on Sysmex CS-series coagulation analyzers-preliminary findings. Res Pract Thromb Haemost [Internet]. 2018 [citado 10 May 2024];22:[about 3 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6178605/pdf/RTH2-2-778.pdf>

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Lidyce Quesada-Leyva (Conceptualización. Análisis formal. Metodología. Investigación. Supervisión. Visualización. Redacción – revisión y edición).

Gerardo Brunet-Bernal (Conceptualización. Análisis formal. Metodología. Investigación. Supervisión).

Ever Quintana-Verdecia (Conceptualización. Análisis formal. Metodología. Investigación. Supervisión).

Mayelin Hernández-Rodríguez (Análisis formal. Metodología. Redacción – revisión y edición).

Millelys Castro-Consuegra (Análisis formal. Visualización. Redacción – revisión y edición).

Zaddys Ahimara Ruiz-Hunt (Análisis formal. Visualización. Redacción – revisión y edición).