



Caracterización genética de aislamientos de SARS-CoV-2 en las diferentes etapas pandémicas de COVID-19 en Cuba

Genetic characterization of SARS-CoV-2 isolates in the different pandemic stages of COVID-19 in Cuba

Liuber Yans Machado Zaldívar^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-5309-8062>

Enrique Noa Romero¹ <https://orcid.org/0000-0003-2656-0228>

Laura Sofía López Rizo¹ <https://orcid.org/0000-0002-6539-8334>

Madeline Blanco de Armas¹ <https://orcid.org/0000-0002-9243-066X>

Nibaldo Luis González Sosa¹ <https://orcid.org/0000-0002-8665-4413>

Juliet Enríquez Puertas¹ <https://orcid.org/0000-0002-3951-2498>

Dania Romay Franchi¹ <https://orcid.org/0000-0002-236X-5873>

María Teresa Pérez Guevara¹ <https://orcid.org/0000-0001-8112-9911>

Danay Carrillo Valdés¹ <https://orcid.org/0000-0002-5506-7240>

Marta Dubed Echevarría¹ <https://orcid.org/0000-0002-0072-8590>

Otto Cruz Sui¹ <https://orcid.org/0000-0003-4029-4253>

Mireida Rodríguez Acosta¹ <https://orcid.org/0000-0002-1574-6951>

¹Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. Mayabeque, Cuba.

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: liuberyans@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El desarrollo de vacunas seguras y eficaces contra el SARS-CoV-2 supuso un enorme reto para enfrentar la pandemia de la COVID-19. La aparición de nuevas variantes del SARS-CoV-2

<http://scielo.sld.cu>

<https://revmedmilitar.sld.cu>



representa un reto en la evaluación de la efectividad de las vacunas, diferentes candidatos vacunales y terapéuticos desarrollados por la comunidad científica.

Objetivos: Caracterizar la diversidad genética de aislamientos virales cubanos en el periodo comprendido entre junio de 2020 y diciembre de 2022.

Métodos: Se obtuvo el ARN de SARS-CoV-2 de 27 aislamientos a partir de sobrenadante de cultivo celular y se secuenció el gen S. Las secuencias generadas se emplearon para la identificación y posterior caracterización molecular de las variantes genéticas del virus mediante análisis filogenético y el uso de las herramientas disponibles en la base de datos GISEAD.

Resultados: Las variantes detectadas en los aislamientos cubanos de SARS-CoV-2 estudiados se correspondieron a las identificadas en los estudios de vigilancia genómica realizados en las diferentes etapas pandémicas de la COVID-19 en Cuba. El 33,3 % de los aislamientos secuenciados correspondieron a los diferentes linajes de la variante Ómicron, seguido de la variante Beta B.1.351 (29,6 %), otros linajes de SARS-CoV-2 (25,9 %), Alfa B.1.1.7 (7,4 %) y Delta B.1.575 (3,7 %). Se detectó la mutación D614G en todos los aislamientos de SARS-CoV-2 estudiados.

Conclusiones: La caracterización molecular de los aislamientos cubanos de SARS-CoV-2 tiene una elevada diversidad genética. Posibilita evaluar *in vitro* e *in vivo* los candidatos vacunales y agentes terapéuticos desarrollados por la industria biofarmacéutica cubana.

Palabras clave: COVID-19; Cuba; diversidad genética; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Introduction: The development of safe and effective vaccines against SARS-CoV-2 posed a huge challenge to face the COVID-19 pandemic. The appearance of new variants of SARS-CoV-2 represents a challenge in evaluating the effectiveness of vaccines, different vaccine and therapeutic candidates developed by the scientific community.

Objectives: Characterize and analyze the genetic diversity of Cuban viral isolates, in the period between June 2020 and December 2022.

Methods: SARS-CoV-2 RNA was obtained from 27 isolates from cell culture supernatant and the S gene was sequenced. The generated sequences were used for the identification and subsequent molecular



characterization of the genetic variants of the virus through phylogenetic analysis and the use of the tools available in the GISEAD database.

Results: The variants detected in the Cuban SARS-CoV-2 isolates corresponded to those identified in the genomic surveillance studies carried out in the different stages of the COVID-19 pandemic in Cuba. 33.3% of the sequenced isolates corresponded to the different lineages of the Omicron variant, followed by Beta B.1.351 (29.6%), other SARS-CoV-2 lineages (25.9%), Alpha B.1.1.7 (7.4%) and Delta B.1.575 (3.7%). The D614G mutation was detected in all SARS-CoV-2 isolates studied.

Conclusions: The molecular characterization of the Cuban isolates of SARS-CoV-2 has a high genetic diversity. It makes it possible to evaluate in vitro and in vivo vaccine candidates and therapeutic agents developed by the Cuban biopharmaceutical industry.

Keywords: COVID-19; Cuba; genetic diversity; SARS-CoV-2.

Recibido: 28/08/2023

Aprobado: 15/02/2024

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la pandemia de la COVID-19, la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 ha conllevado a la obtención de más de 15 millones de aislados de virus que han sido sometidos a secuenciación parcial o completa del genoma.⁽¹⁾ Este panorama cambió durante los últimos meses de 2020 con los primeros reportes de variantes emergentes de SARS-CoV-2 asociadas con mayor transmisibilidad, gravedad de la enfermedad y escape a la inmunidad humoral.⁽²⁾ Aunque el genoma del SARS-CoV-2 parece relativamente estable, este tipo de virus ARN de cadena simple acumula una tasa de mutaciones estimada en torno a 10^{-6} - 10^{-4} por ciclo replicativo. Dichas mutaciones pueden afectar al gen que codifica el antígeno espicular (S), que interactúa con el receptor específico de la célula huésped, y seleccionan variantes mutantes con alteraciones en su capacidad infectiva, potencial patogenicidad y resistencia a los anticuerpos neutralizantes.^(1,2)

<http://scielo.sld.cu>

<https://revmedmilitar.sld.cu>



A raíz de ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽³⁾ propuso una denominación para nombrar a las variantes emergentes de SARS-CoV-2, con el empleo de letras del alfabeto griego y la nomenclatura científica según los diferentes linajes. Desde la descripción de los primeros casos de la COVID-19 en el mundo, se han descrito más de 20 variantes de SARS-CoV-2, con múltiples linajes; con predominio de una variante viral en cada pico pandémico. Los estudios^(4,5,6) de vigilancia genómica realizados en Cuba han detectado la presencia de múltiples variantes del SARS-CoV-2, con predominio de la cepa viral D614G, y las variantes de preocupación (VOC, siglas del inglés) Beta, Delta y Ómicron, durante las diferentes oleadas pandémicas descritas en el país.

La aparición y presencia de diversas variantes genéticas del SARS-CoV-2 ha constituido un reto para la industria biofarmacéutica cubana, encargada desde los inicios de la pandemia de la COVID-19, del desarrollo de agentes terapéuticos y vacunas. A partir del aislamiento del SARS-CoV-2 en las instalaciones de nivel de seguridad biológica 3 (NSB3) del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC),⁽⁷⁾ la evaluación *in vitro* e *in vivo* de la efectividad de los productos desarrollados por BioCubafarma, para enfrentar la COVID-19, frente a las diferentes variantes del SARS-CoV-2 detectadas en Cuba, constituyó un requisito durante el proceso de su aprobación y registro. Esto conllevó a la necesidad de caracterizar genéticamente los aislamientos de SARS-CoV-2, para su posterior empleo en ensayos preclínicos y clínicos de productos biofarmacéuticos.

El objetivo del presente estudio es caracterizar genéticamente los aislamientos de SARS-CoV-2 cubanos, en el periodo comprendido entre junio de 2020 y diciembre de 2022.

MÉTODOS

Se realizó un estudio de corte transversal. Se procesaron 27 cultivos virales del SARS-CoV-2 obtenidos según el procedimiento descrito por Noa y otros,⁽⁷⁾ en las instalaciones del laboratorio de NSB3 del CICDC, durante el período de abril de 2020 a diciembre de 2022.



Los cultivos virales se obtuvieron a partir del exudado nasofaríngeo de pacientes diagnosticados de la COVID-19, con un valor umbral de ciclo (Ct) de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR), en el momento del diagnóstico, menor de 25.

Se realizó la extracción del ARN viral a partir del sobrenadante de los cultivos virales del SARS-CoV-2, el cual se empleó para la amplificación y secuenciación de un fragmento de 1836 pares de bases del gen S (posiciones 21976-23812), siguiendo las instrucciones descritas en el protocolo del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).⁽⁸⁾

Las mutaciones se identificaron mediante el algoritmo de interpretación *CoVsurver: Mutation Analysis of hCoV-19* (<https://www.gisaid.org/epiflu-applications/covsurver-mutations-app>).

La designación de las variantes de los aislamientos estudiados se asignó de acuerdo con el perfil mutacional descrito previamente, para cada variante conocida según la herramienta *Audacity Instant* (<https://gisaid.org/database-features/audacity-instant-app/>).

Se realizó un análisis filogenético mediante el empleo de las herramientas disponibles en el paquete de programas MEGA v 5.0⁽⁹⁾ y se construyó un árbol filogenético según el modelo de sustitución nucleotídica T92+G+I.

Los procedimientos éticos se llevaron a cabo según las exigencias o normas del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba y el Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), que contempla los principios enunciados en la declaración de Helsinki.

RESULTADOS

En el estudio las variantes de SARS-CoV-2 detectadas fueron: Ómicron con sus diferentes linajes (33,3 %), Beta B 1.351 (29,6 %), otros linajes de SARS-CoV-2 (25,9 %), Alfa B 1.1.7 (7,4 %) y Delta B 1.575 (3,7 %) (tabla 1).



Tabla 1 - Variantes del SARS-CoV-2 detectada en los 27 aislamientos obtenidos durante el período de junio de 2020 y diciembre de 2022

Código de la Cepa	Código GISAID	Variante	Linaje	Clado	Año de aislamiento
DC01	EPI_ISL_7495115	-	B.1	GH	2020
DC02	EPI_ISL_7495120	-	B.1.517	GH	2020
DC03	EPI_ISL_7495130	Alfa	B.1.1.7	GRY	2020
DC04	EPI_ISL_7495135	Beta	B.1.351	GH	2021
DC05	EPI_ISL_7495138	Delta	B.1.575	GK	2021
DC06	EPI_ISL_7495141	Beta	B.1.351	GH	2021
DC07	EPI_ISL_7495144	Beta	B.1.351	G	2021
DC08	EPI_ISL_7495152	Beta	B.1.351	GH	2021
DC09	EPI_ISL_7495159	-	B.1.1.222	GR	2020
DC10	EPI_ISL_7495166	-	B.1.1777	GV	2020
DC11	EPI_ISL_7495172	-	B.1575	G	2021
DC12	EPI_ISL_7495177	-	B.1.2	GH	2020
DC13	EPI_ISL_7495188	Beta	B.1.351	GH	2021
DC14	EPI_ISL_7495197	Beta	B.1.351	GH	2021
DC15	EPI_ISL_7495206	Alfa	B.1.1.7	GRY	2021
DC16	EPI_ISL_7495215	Beta	B.1.351	GH	2021
DC17	EPI_ISL_7495221	-	B.1.258	G	2020
DC18	EPI_ISL_7495226	Beta	B.1.351	GH	2021
2202	EPI_ISL_12691753	Ómicron	BA1.2.21K	GRA	2022
2301 (8)	EPI_ISL_17788608	Ómicron	BA.5.2	GRA	2022
2302 (12)	EPI_ISL_17788609	Ómicron	BQ.1.13	GRA	2022
2303 (25)	EPI_ISL_17788610	Ómicron	BQ.1.1	GRA	2022
2304 (83)	EPI_ISL_17788611	Ómicron	BQ.1.1.23	GRA	2022
2305 (88)	EPI_ISL_17789272	Ómicron	BQ.1.1.32	GRA	2022
2306 (C15)	EPI_ISL_17789346	Ómicron	BQ.1.1	GRA	2022
2307 (C16)	EPI_ISL_17789347	Ómicron	XBB6.1	GRA	2022
2308 (C17)	EPI_ISL_17789349	Ómicron	XBB6.1	GRA	2022

Durante el período comprendido entre mayo de 2020 y enero de 2021 se aisló la variante del SARS-CoV-2, perteneciente al linaje B.1 (conocida como variante D614G), seguido de las variantes Alfa B 1.1.7 y Beta B 1.351. Entre los meses de mayo y noviembre de 2021, se aislaron las variantes Delta



B.1.617.2 y otra parte de Beta B.1.351. En este tiempo se detectaron, además, virus cercanos filogenéticamente a las variantes B 1.429+B1.427 y la C36.3 (Fig.1). Ya en diciembre de 2021 y hasta diciembre de 2022, se aislaron diversos linajes pertenecientes a la variante Ómicron (B.A 1.2.21K, BA.5.2, BQ.1.1; BQ 1.13, BQ 1.1.23, BQ1.1.32, XXB6.1).

La mutación D614G se detectó en todos los aislamientos de SARS-CoV-2 secuenciados. La variante Ómicron presentó mayor número de mutaciones en la región del genoma que codifica para la proteína S (más de 30), seguido de la variante Delta con 11 mutaciones y las variantes Alfa y Beta con 10, respectivamente.

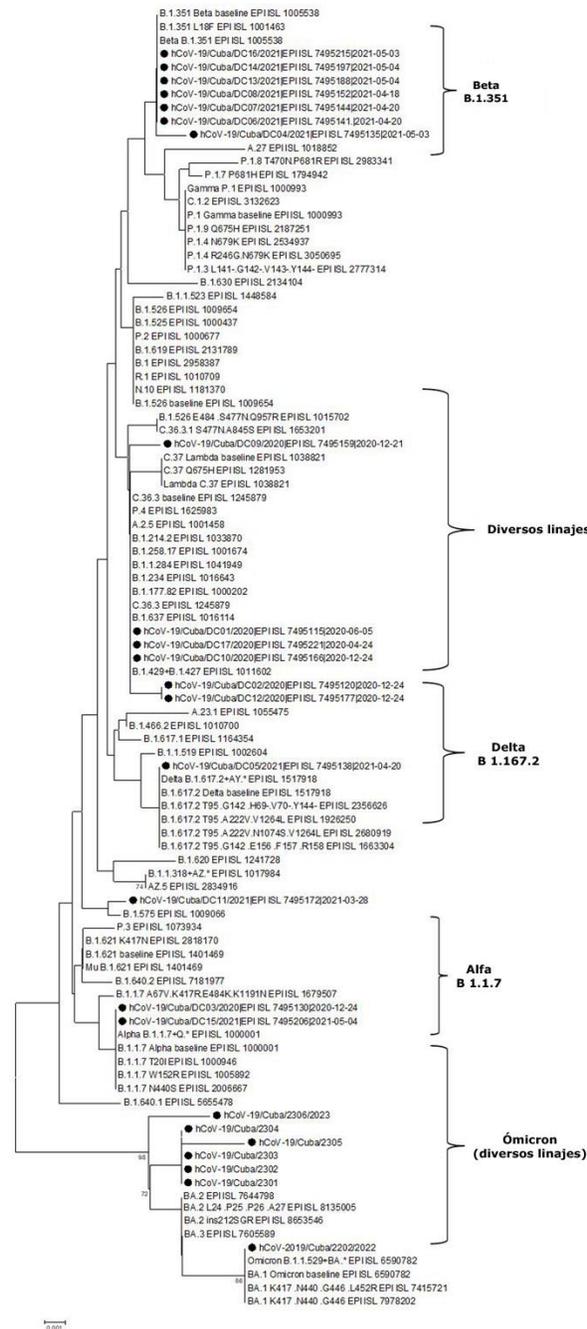


Fig. 1- Árbol filogenético de las secuencias del gen SARS-CoV-2 S de los 27 aislamientos analizados. Los aislamientos de SARS-CoV-2 cubanos se indican con el símbolo ●. El árbol se construyó por el método de máxima verosimilitud y la distancia genética se estimó según el modelo T92+G+I. Los números cerca de los nodos representan valores de *bootstrap* (1000 repeticiones).



DISCUSIÓN

Desde el diagnóstico de los primeros casos de la COVID-19 en Cuba, una de las principales misiones del CICDC fue la obtención de aislamientos virales de SARS-CoV-2 a partir del exudado nasofaríngeo de personas positivas a la infección y su posterior caracterización genética para la designación de la variante viral. Esto permitiría su posterior empleo en la evaluación de la efectividad de los agentes terapéuticos y vacunas contra este coronavirus, desarrollados por la industria biofarmacéutica cubana.

El primer aislamiento de SARS-CoV-2 en Cuba, obtenido en las instalaciones del laboratorio NSB3 del CICDC, correspondió a la cepa viral D614G, cuya circulación se había detectado en los estudios de vigilancia genómica realizados por el Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) durante el año 2020.⁽⁴⁾ La D614G es una mutación no sinónima implicada en la unión del ligando al receptor celular ACE-2 y se ha detectado en las variantes y linajes surgidos posteriormente, como parte de la dinámica evolutiva del SARS-CoV-2. El análisis estructural sugiere que D614G altera la conformación de unión del receptor, lo que hace más probable la unión y fusión con el ACE-2, lo que se ha asociado con una mayor virulencia, transmisibilidad y capacidad de supervivencia viral.⁽¹⁰⁾

Estudios de vigilancia genómica realizados en Cuba en los primeros 5 meses de 2021,^(2,10,11,12) detectaron la circulación de 16 variantes de SARS-CoV-2, con predominio de las variantes Alfa B.1.1.7 y Beta B.1.351, lo que coincide con los aislamientos obtenidos en ese período pandémico. Las mutaciones descritas en Alfa B.1.1.7 se han relacionado con un aumento en la transmisibilidad. Varios estudios^(5,13,14,15) han asociado la variante Beta B 1.351 con un aumento en la incidencia, disminución de la respuesta a los anticuerpos neutralizantes ante diferentes formatos de vacunas, así como a un posible riesgo de hospitalización, gravedad clínica y mortalidad.

El tercer período de transmisión en Cuba se produjo entre julio y septiembre de 2021, con un predominio de la variante Delta (B.1.575). Esta variante es más transmisible con estimaciones superiores al 60 % en comparación con otras descritas anteriormente. Según GISAID, el 90 % de las secuencias globales de junio a septiembre de 2021 fueron Delta. Estos valores se reflejan en los casos confirmados⁽¹⁶⁾ de la



COVID-19 en Cuba en ese período, en el cual se detectaron 688532 casos (6155 casos x 100 000 habitantes), con un aumento de 57,11 veces respecto al total de casos notificados en 2020.

La variante Ómicron irrumpió en Cuba en un escenario donde Delta era la variante circulante predominante y la desplazó rápidamente, sustentada en su mayor tasa de transmisión, infectividad y escape vacunal.^(17,18) Las causas de dicho comportamiento se deben a que Ómicron se diferencian de otras variantes, por la presencia de numerosas mutaciones en su genoma. Hay más de 30 mutaciones en la proteína S,⁽¹⁹⁾ que es la encargada de reconocer las células del huésped y es el principal objetivo de las respuestas inmunitarias del organismo, y por tanto es fundamental en la infección del virus y blanco antigénico de la mayoría de las vacunas. Sin embargo, a pesar de ser más transmisible, su efecto no fue mayor, debido a la amplia cobertura de vacunación en el país con las vacunas Soberana Abdala, y a la rápida implementación de las dosis de refuerzo.⁽⁶⁾

La caracterización genética de los aislamientos virales cubanos de SARS-CoV-2 obtenidos en el laboratorio NSB3 del CICDC muestra una elevada diversidad genética, lo que permite la confección de un cepario de este coronavirus, para su empleo en la evaluación *in vitro* e *in vivo* de agentes terapéuticos y candidatos vacunales desarrollados por la industria biofarmacéutica cubana.

La caracterización molecular de los aislamientos cubanos de SARS-CoV-2 tiene una elevada diversidad genética. Posibilita evaluar *in vitro* e *in vivo* los candidatos vacunales y agentes terapéuticos desarrollados por la industria biofarmacéutica cubana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez-Abeledo, M, and J C Sanz Moreno. SARS-CoV-2 variants, a still unfinished story. *Vacunas*. 2021; 22(3):173-9. DOI: 10.1016/j.vacun.2021.06.003
2. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta R, de Olivera T, Kosakovsky Pond-S, et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews/Genetics*. 2021; 22: 757-73. DOI: 10.1038/s41576-021-00408-x
3. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants 2022. WHO; 2022. [acceso: 26/06/2023]. Disponible en: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>

<http://scielo.sld.cu>

<https://revmedmilitar.sld.cu>



4. Pérez L, Tejero Y, Aguado ME, Valdés O, Álvarez M, Kourí V, et al. Sequencing of S and N genes of SARS-CoV-2 strains circulating in Cuba during March- September 2020. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 2022;12 (3): 78-88. DOI: 10.5799/jmid.1175386
5. Guzmán MG, Pérez L, Tejero Y, Mederos D, Aguado ME, Pintos Y, et al. Emergence and evolution of SARS-CoV-2 genetic variants during the Cuban epidemic. *J Clin Virol Plus*. 2022; 2(4):100104. DOI: 10.1016/j.jcvp.2022.100104
6. Pérez-Santos L, Kourí-Cardellá V, Tejero-Suárez Y, Macías-Roig L, Pintos-Saavedra Y, Medero-Díaz D, et al. Epidemiological characterization of patients in the first eight weeks following detection of SARS-CoV-2 B.1.529 (omicron) variant in Cuba: MEDICC Review. 2022; 24(3-4):18-23. DOI: 10.37757/MR2022.V24.N3-4.6
7. Noa Romero E, Enriquez Puertas JM, Machado Zaldívar LY, González Sosa NL, Montero González TJ, Falcón Cama V, et al. SARS-CoV-2 Isolation from Cuban COVID-19 Patients. *American Journal of Rare Disorders: Diagnosis and Therapy*. 2020 [acceso: 26/06/2023]; 3(1):009-015. Disponible en: <https://www.sciresliterature.org/RareDisorders/AJRDDT-ID18.pdf>
8. CDC. Protocols for SARS-CoV-2 sequencing. U.S. Department of Health & Human Services; 2020. [acceso: 26/06/2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/amd/training/covid-toolkit/module3-6.html>
9. Tamura KD, Peterson D. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28(10):2731-39. DOI:10.1093/molbev/msr121
10. Laha S, Chakraborty J, Das S, Manna SK, Biswas S, Chatterjee R. Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. *Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2020; 85: 104445. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104445
11. Gouvea dos Santos W. Impact of virus genetic variability and host immunity for the success of COVID-19 vaccines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021; 136: 111272. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111272



12. Brown JC, Goldhill DH, Barclay WS. Increased transmission of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 (VOC 202012/01) is not accounted for by a replicative advantage in primary airway cells or antibody escape. *bioRxiv preprint*. 2021. DOI: 10.1101/2021.02.24.432576
13. Cathcart AL, Havenar-Daughton C, Lempp FA, Ma D, Schmid MA, Agostini ML, et al. The dual function monoclonal antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent in vitro and in vivo activity against SARS-CoV-2. *bioRxiv preprint*. 2021. DOI: 10.1101/2021.03.09.434607
14. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Barnes CO, Finkin S. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*. 2021; 592: 616-622. DOI: 10.1038/s41586-021-03324-6
15. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, Starr TN, Malone K, Chu HY, et al. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host & Microbe*. 2021; 29(3):463-76. DOI: 10.1016/j.chom.2021.02.003
16. Beldarraín E, Alfonso I, Morales I, Durán F. Primer acercamiento histórico-epidemiológico a la COVID-19 en Cuba. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 2020; 10(2):[aprox. 14 p.]. Disponible en: <https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/862/866>
17. Fall A, Eldesouki RE, Sachithanandham J, Paul Morris C, Norton JM, Gaston DC, et al. The displacement of the SARS-CoV-2 variant Delta with Omicron: An investigation of hospital admissions and upper respiratory viral loads. *eBioMedicine*. 2022; 79:104008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104008>
18. Mohapatra RK, Tiwari R. Twin combination of Omicron and Delta variants triggering a tsunami wave of ever high surges in COVID-19 cases: A challenging global threat with a special focus on the Indian subcontinent. *J Med Virol*. 2022; 94(5):1761-5. DOI: 10.1002/jmv.27585
19. Callaway E. Heavily mutated coronavirus variant puts scientists on alert. *Nature*. 2021; 600(7887): 21. DOI: 10.1038/d41586-021-03552-w



Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés con respecto a la presente investigación.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: *Liuber Yans Machado Zaldivar, Enrique Noa Romero, Madeline Blanco de Armas.*

Curación de datos: *Liuber Yans Machado Zaldivar, Laura Sofía López Rizo, Nivaldo Luis González Sosa, Juliet Enriquez Puertas, Danay Carrillo Valdés.*

Análisis formal: *Liuber Yans Machado Zaldivar, Enrique Noa Romero, Laura Sofía López Rizo, Madeline Blanco de Armas, Juliet Enriquez Puertas, Nivaldo Luis González Sosa.*

Investigación: *Liuber Yans Machado Zaldivar, Laura Sofía López Rizo, Enrique Noa Romero, Madeline Blanco de Armas, Dania Romay Franchi, Nivaldo Luis González Sosa Juliet Enriquez Puertas.*

Metodología: *Liuber Yans Machado Zaldivar, Laura Sofía López Rizo, María Teresa Pérez Guevara.*

Administración del proyecto: *Enrique Noa Romero, Liuber Yans Machado Zaldivar.*

Supervisión: *Otto Cruz Sui, Marta Dubed Echevarría, María Teresa Pérez Guevara, Mireida Rodríguez Acosta.*

Redacción-borrador original: *Liuber Yans Machado Zaldivar, Laura Sofía López Rizo.*

Redacción-revisión y edición: *Liuber Yans Machado Zaldivar, Madeline Blanco de Armas, Enrique Noa Romero, Marta Dubed Echevarría, Otto Cruz Sui, María Teresa Pérez Guevara, Mireida Rodríguez Acosta.*