

Sistema antioxidante enzimático en mujeres con diagnóstico de Atipias celulares y Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I

Enzymatic antioxidant system in women diagnosed with cell atypia and grade I cervical intraepithelial neoplasia

Danay Heredia Ruiz^{1*} ORCID: 0000-0002-1985-6912

Manuela Herrera Martínez¹ ORCID: 0000-0002-6556-2771

Douglas Fernández Caraballo¹ ORCID: 0000-0001-7206-6832

Lázara Gladys López Ocampo¹ ORCID: 0000-0001-9198-5156

María Bárbara Gómez Monteagudo¹ ORCID: 0000-0002-6085-9234

Emilio Francisco González Rodríguez¹ ORCID: 0000-0002-7495-3483

¹Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Unidad de Investigaciones Biomédicas. Villa Clara, Cuba.

*Autor para la correspondencia: danayhr@infomed.sld.cu o danayhr75@gmail.com

RESUMEN

Introducción: El virus de papiloma humano *per se* no es capaz de desarrollar todas las transformaciones neoplásicas en el cérvix uterino, de manera que factores de riesgo como los genéticos, ambientales, estilo de vida sexual y el desbalance oxidativo podrían contribuir a la enfermedad.

Objetivo: Determinar el comportamiento del sistema enzimático antioxidante en mujeres con atipia de células escamosas de significado indeterminado y neoplasia intraepitelial cervical grado I.

Métodos: Se conformaron tres grupos de estudio: el primero incluyó 30 mujeres con diagnóstico de atipias, el segundo se constituyó con 40 mujeres con neoplasia intraepitelial grado I y el tercero consistió en 30 mujeres con citología negativa tomadas como control, provenientes de la consulta de Patología de Cuello del “Agustín Gómez Lubián” de Santa Clara. Mediante métodos espectrofotométricos se determinaron los niveles de actividad

enzimática superóxido dismutasa y catalasa así, como las concentraciones de glutatión reducido. Las comparaciones se realizaron con el programa SPSS, versión 18.

Resultados: En el grupo de atipias, aunque los tres parámetros tuvieron una tendencia a la disminución no hubo diferencias significativas con respecto al control. Mientras que el grupo de neoplasia grado I evidenció disminución significativa de los tres indicadores estudiados al ser comparados con el grupo control.

Conclusiones: Se constató afectación del sistema antioxidante enzimático en el grupo de neoplasia grado I, lo cual podría considerarse un cofactor importante en la progresión de las lesiones en el cérvix uterino.

Palabras clave: sistema antioxidante enzimático; atipia celular; neoplasia intraepitelial cervical.

ABSTRACT

Introduction: Human papillomavirus *per se* can not carry out all the neoplastic transformations occurring in the uterine cervix. Genetic and environmental risk factors as well as sexual behavior and oxidative imbalance may also play a role.

Objective: Determine the behavior of the enzymatic antioxidant system in women with squamous cell atypia of indeterminate significance and grade I cervical intraepithelial neoplasia.

Methods: Three study groups were formed. The first group included 30 women diagnosed with atypia, the second group was made up of 40 women with grade I intraepithelial neoplasia, and the third or control group consisted of 30 women with negative cytology from Agustín Gómez Lubián Cervical Pathology service in Santa Clara. Spectrophotometric methods were used to determine the levels of superoxide dismutase and catalase enzymatic activity, as well as the concentrations of reduced glutathione. Comparisons were made with the SPSS software, version 18.

Results: In the atypia group the three parameters showed a decreasing tendency, but differences with respect to the control group were not significant. In the grade I neoplasia group, however, a significant reduction was found of the three study indicators when compared with the control group.

Conclusions: Damage to the enzymatic antioxidant system was observed in the grade I neoplasia group. This could be considered to be an important cofactor in the progress of uterine cervix lesions.

Key words: enzymatic antioxidant system, cell atypia, cervical intraepithelial neoplasia.

Recibido: 09/07/2019

Aceptado: 06/09/2019

Introducción

Según la Organización Mundial de Salud (OMS), el cáncer cérvico-uterino (CCU) ocupa el segundo lugar en mortalidad femenina en el mundo con unas 270 000 muertes cada año, donde el 85 por ciento ocurre en países subdesarrollados. En Cuba, a pesar del Programa Nacional de Prevención Precoz, esta patología ocupa la quinta causa de mortalidad por tumores malignos en la mujer, con 530 defunciones en el año 2017.⁽¹⁾

Múltiples estudios han referido que el agente causal o factor de riesgo más importante en el desarrollo de lesiones cérvico-uterinas lo constituye la infección por virus de papiloma humano (VPH), pues su presencia se ha constatado en el 99 % de los casos de CCU.⁽²⁾ No obstante, la infección *per se* no es capaz de desarrollar todos los eventos carcinogénicos, de manera que otros factores de riesgo como los genéticos, ambientales, de estilo de vida sexual y el desbalance oxidativo pudieran contribuir a la patología.

Los factores genéticos están relacionados en gran medida con la inmunidad innata y adquirida, la susceptibilidad individual a padecer la enfermedad y a la oncogenicidad del virus. Los factores ambientales por su parte se relacionan con la exposición a tóxicos, sustancias teratógenas producidas por el consumo de tabaco, píldoras anticonceptivas y alcohol. Mientras que los estilos de vida sexuales involucran el comienzo temprano de las relaciones sexuales, el número de compañeros sexuales, la paridad, el número de abortos, las ITS previas, entre otros.⁽³⁾

Gran parte de estos factores se relacionan directamente con el incremento de especies reactivas del oxígeno (ERO) o radicales libres (RL) que en consecuencia provocan desbalance entre antioxidantes y pro-oxidantes.⁽⁴⁾ Los cambios bioquímicos a nivel de la mucosa cervical y en el organismo potencian el estado de estrés oxidativo (EO), lo cual pudiera contribuir de manera importante al desarrollo de la patología.

El sistema antioxidante es considerado la primera línea de defensa natural para reducir los daños provocados por los RL, el cual involucra antioxidantes tanto de origen endógeno como exógenos. Los endógenos incluyen las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y Glutathion peroxidasa (Gpx), a los cuales se adicionan cofactores enzimáticos como el zinc, el cobre, el manganeso, el glutatión, entre otros. Mientras que

los antioxidantes exógenos proceden fundamentalmente de la dieta e incluyen vitaminas (E, C, A, flavonoides, etc.) y oligoelementos.⁽⁵⁾

Cualquier afectación del sistema antioxidante puede conducir a consecuentes alteraciones de la homeostasis intracelular y causar daño a importantes componentes de la célula como los lípidos de la membrana, proteínas estructurales y enzimáticas, carbohidratos y ácido nucleicos. Una vez que el exceso de oxidantes supere la defensa antioxidante y/o los mecanismos reparadores del ADN podría producirse injuria y/o muerte celular e impactar en el desarrollo de lesiones precursoras a cáncer.⁽⁶⁾

Las razones antes mencionadas nos motivaron a determinar el comportamiento del sistema enzimático antioxidante en mujeres con atipia de células escamosas de significado indeterminado (por sus siglas en inglés - ASCUS) y neoplasia intraepitelial cervical grado I (NIC I) en el cérvix uterino.

Métodos

Se realizó una investigación analítica transversal, con diseño de casos y controles en el Laboratorio de Química Sanguínea de la Unidad de Investigaciones Biomédicas, perteneciente a la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, con la colaboración de la consulta de Ginecología (Patología de Cuello) del policlínico “Agustín Gómez Lubián” de Santa Clara, durante el año 2018.

Teniendo en cuenta criterios de inclusión/rechazo y el consentimiento de las participantes, se seleccionaron un total de 100 mujeres con edades comprendidas entre 25 y 65 años, tomadas al azar. Se conformaron tres grupos: el primero se constituyó con 30 mujeres con ASCUS, el segundo con 40 mujeres con NIC I y el tercero con 30 mujeres con citología negativa tomadas como control. En todos los grupos el diagnóstico se realizó mediante la citología cérvico-vaginal (Test de Papanicolau) y los casos fueron corroborados por colposcopia.

Para el estudio del sistema enzimático antioxidante, se extrajo una muestra de 5mL de sangre por punción venosa, la cual se depositó sobre 100 µL de anticoagulante EDTA al 5,6 %. Mediante el proceso de centrifugación se obtuvo el plasma en el cual se determinaron las actividades enzimáticas Superóxido dismutasa y Catalasa (CAT), así como las concentraciones de glutatión reducido (GSH).

Las técnicas analíticas emplearon métodos espectrofotométricos (Genesys 10 UV ®), con reactivos de alta calidad suministrados por las firmas Merck y HELFA.

La determinación de la actividad enzimática SOD extracelular, se realizó mediante el método cinético descrito por *Marklund* (1990), la CAT por el método cinético de *Aebi* (1974) y la concentración de proteínas totales por el método de *Lowry* (1951), usada para referir las unidades de actividades enzimáticas específicas (UAEE= UAE/mg de proteínas). Por otra parte, la concentración de GSH se realizó a través del método descrito por *Beutler* (1986).

A partir de una base de datos se realizó el análisis estadístico mediante el programa SPSS, versión 18.0 de Windows® XP Titan Ultimate. Se determinaron los estadísticos de grupo para cada variable en estudio y se comprobó al aplicar el test de bondad de ajuste *Shapiro Wills* que los datos no cumplían una distribución normal ($p < 0,05$). Por tanto, para comparar los rangos medios se utilizaron pruebas no paramétricas, específicamente el test de Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95 %.

La investigación parte de un proyecto nacional contratado por el CITMA, diseñado y aprobado tanto por el Comité Científico como por el de Ética de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, teniendo en cuenta las regulaciones éticas para el trabajo en humanos. Las explicaciones objetivas del estudio fueron expuestas por el equipo multidisciplinario de investigadores a las mujeres participantes en el estudio, las cuales emitieron su autorización por escrito (consentimiento), respetándose el principio de autonomía.

Resultados

La edad promedio de las mujeres participantes en la investigación fue de 49 años.

Los estadísticos descriptivos de la actividad de las enzimas SOD y CAT, y las concentraciones de GSH en los tres grupos de estudio se muestran en la tabla; así como la significación estadística de las comparaciones entre los grupos 2 a 2.

Tabla- Estadísticos descriptivos y comparaciones de las variables SOD, CAT y GSH en mujeres con ASCUS y NIC I

Variables de estudio	Grupos de estudio	n	Media (X ± DS)	Intervalo de confianza de la media al 95 %		Significación (p) CASO-CONTROL	Significación (p) ASCUS-NIC I
				Límite Inferior	Límite superior		
Enzima SOD (UAE/mg de proteínas)	Control	30	0,055 ± 0,021	0,045	0,064		0,958
	ASCUS	30	0,046 ± 0,015	0,038	0,053	0,108	
	NIC I	40	0,044 ± 0,026	0,034	0,054	0,028*	
Enzima CAT (UAE/mg de proteínas)	Control	30	0,482 ± 0,178	0,414	0,550		0,272
	ASCUS	30	0,421 ± 0,177	0,338	0,504	0,246	
	NIC I	40	0,367 ± 0,146	0,311	0,424	0,012*	
GSH (µM)	Control	30	12,224 ± 8,859	8,895	14,794		0,330
	ASCUS	30	9,200 ± 3,412	7,603	10,796	0,157	
	NIC I	40	8,250 ± 3,542	6,876	9,623	0,045*	

*nivel de significación al 95 %.

Las figuras 1 y 2 muestran los niveles de SOD y CAT respectivamente en los tres grupos de estudio, y se observa que aunque en las pacientes con ASCUS hay una tendencia a la disminución de ambas enzimas, no existen diferencias significativas con respecto al control. Por su parte, el grupo de pacientes con NIC I evidencia una disminución estadísticamente significativa de SOD y CAT.

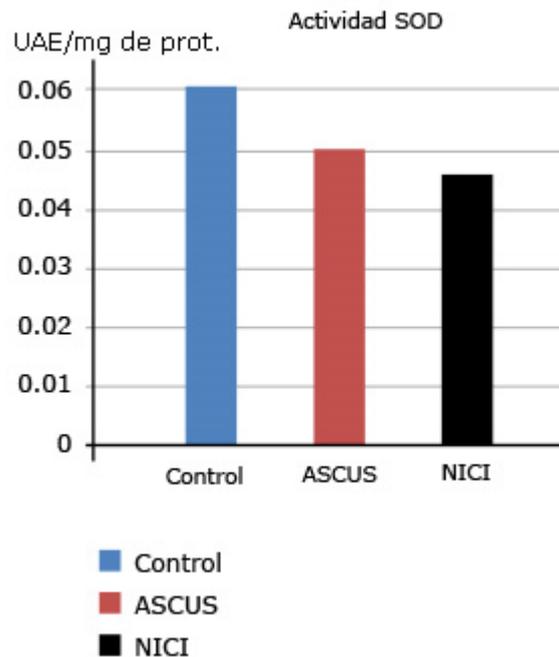


Fig. 1- Niveles de actividad enzimática Superóxido dismutasa.

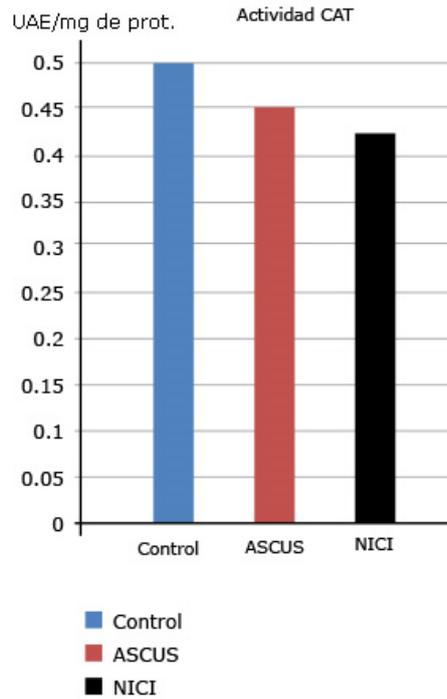


Fig. 2- Niveles de actividad enzimática Catalasa.

La figura 3 expone los niveles de GSH y aunque en ambos grupos de casos los valores disminuyeron, solo hubo diferencias significativas en el grupo de NIC I.

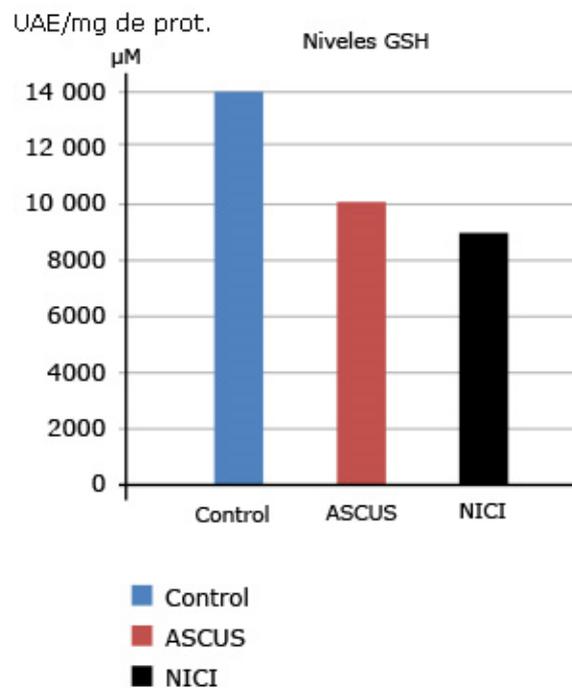


Fig. 3- Niveles de glutatión reducido.

Al establecer comparaciones entre las variables de estudio en ambos grupos de casos (ASCUS-NICI), no se evidenció diferencias estadísticas significativas.

Discusión

La actividad genotóxica del EO y la inestabilidad genómica inducida por el VPH pueden actuar de manera independiente y generar el daño molecular necesario para el desarrollo de las células neoplásicas. También la interacción del EO puede incidir sobre uno o más estados de iniciación neoplásica y/o en la progresión que induce la infección por el VPH.⁽⁷⁾

La función catalítica de la enzima SOD consiste en la dismutación del radical superóxido ($O^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El radical $O^{\cdot-}$ es altamente tóxico y activo, y aunque tiene una capacidad de difusión limitada a canales específicos se considera la principal ERO que reacciona con un mayor número de moléculas para formar otras especies secundarias, donde participa directa o indirectamente en reacciones catalizadas por metales de transición entre los que destacan el hierro y el cobre. De manera que la disminución de la actividad de la enzima SOD en las mujeres con NIC I evidenciada en este estudio puede afectar su acción defensiva contra el potencial daño que produce el radical $O^{\cdot-}$ generado en todas las reacciones metabólicas aeróbicas.⁽⁸⁾

La enzima CAT también mostró niveles disminuidos en las mujeres con NIC I lo cual podría deberse entre otros factores a la disminución de formación de H_2O_2 (sustrato de la enzima CAT) producto a una menor actividad enzimática SOD. De esta forma se afectaría la función catalítica de la CAT, basada en la transformación del H_2O_2 a H_2O y oxígeno molecular.

El H_2O_2 no es una ERO en sí, sino una especie química intermediaria estable relacionada con los RL que resulta de la reducción o metabolismo de estos.⁽⁸⁾ Es capaz de difundirse rápidamente y resulta un candidato ideal para la señalización intracelular.⁽⁹⁾ Producto a la disminución de la actividad CAT y en presencia de Fe^{2+} y Cu^{2+} una mayor cantidad de H_2O_2 puede reaccionar con estos metales generando el radical hidroxilo ($\cdot OH$), en un proceso llamado reacción de *Fenton*.⁽¹⁰⁾ Este radical es considerado el más reactivo de todos, provocando daños considerables a diferentes macromoléculas.

Por otra parte, la concentración de GSH también disminuyó en los casos con respecto al control. Esta biomolécula aunque es un antioxidante no enzimático se considera el tiol

intracelular barredor de RL de mayor prevalencia, que actúa como cofactor de varias enzimas entre la que se encuentra la Gpx. Entre sus múltiples funciones está la de poseer una actividad antioxidante intracelular decisiva en la protección a lípidos de la membrana; por lo que se ha descrito que las células carentes de glutatión generalmente sufren un severo daño oxidativo asociado a peroxidación lipídica y degeneración mitocondrial.⁽¹¹⁾

La afectación del sistema antioxidante enzimático se ha observado en varios estudios realizados en atipias y neoplasias cervicales⁽¹²⁻¹⁴⁾, y podría deberse a diversas razones entre las que se incluyen la escases de elementos trazas tales como el Zn, el Cu, el Fe y el Mn considerados importantes cofactores enzimáticos; a la generación de especies reactivas (ER) derivadas del óxido nítrico (NO·) relacionadas con las células inflamatorias que actúan sobre la división de las células epiteliales vecinas produciendo mutaciones somáticas cruciales en los genes que causan cáncer, y aquellas ER implicadas en la permeabilidad vascular. Sin dejar de mencionar, que el daño que se produce a las enzimas por reacción cruzada o daño al ADN nuclear podría inducir peroxidación lipídica que influye en la rigidez y deformabilidad celular.

Resultados similares a los nuestros han sido reportados por *Dasari* y otros⁽¹⁵⁾ donde evaluaron marcadores de EO en pacientes con lesiones intraepiteliales y/o verrugas, en dos grupos con CCU antes y después del tratamiento de quimioterapia, y en dos grupos con CCU en pre y post tratamientos conjuntos de radioterapia y quimioterapia. Encontrando disminución del sistema antioxidante enzimático y aumento de la peroxidación lipídica en todos los casos con respecto a controles sanos.

Algunos autores^(16,17) han referido una correlación positiva entre los niveles antioxidantes y el desarrollo de lesiones cervicales, lo cual explica la capacidad de adaptación celular a un microambiente oxidante que limita al sistema inmune local y favorece la persistencia e integración del VPH. Tal es así que se ha descrito que la enzima CAT juega un importante rol en la respuesta adaptativa celular en la adquisición de tolerancia al EO, aunque esto ha sido descrito con mayor énfasis en estadios avanzados de la enfermedad con aplicación de terapias antineoplásicas.⁽¹⁸⁾

También se ha descrito que la inflamación crónica asociada a la infección persistente con VPH de alto riesgo (VPH-AR) puede conducir a la producción y liberación de ERO por activación de neutrófilos y macrófagos asociados a la respuesta inmune local que alteran el metabolismo de la célula infectada y contribuye a la transformación celular.⁽¹⁹⁾

Se evidenció afectación del sistema enzimático antioxidante en las mujeres con diagnóstico de NIC I. Si bien este tipo de lesión se considera un estadio precoz de la enfermedad que

puede regresar espontáneamente hacia la curación, es importante referir que las ERO pueden contribuir a la persistencia del VPH y progresión a lesiones de alto grado. El desbalance a favor de los pro-oxidantes podría conllevar a modificaciones en importantes biomoléculas que causan daño y muerte celular.

Referencias bibliográficas

1. Anuario Estadístico de Salud 2017. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. La Habana. 2018 [acceso 17/04/2018]. Disponible en: <http://www.infomed.sld.cu/>
2. Gupta S, Kumar P, Das B. HPV: Molecular pathways and targets. *Curr Probl Cancer*. 2018 [acceso 12/09/2018];42:161-174. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147027218300771>
3. Cabrera Guerra I, Ortiz Sánchez Y, Suárez Gómez Y, Socarrás Rodríguez R, Vázquez Rosales N. Factores de riesgo asociados al cáncer cérvicouterino en el área de salud de Santa Rita. *Multimed*. 2017 [acceso 08/02/2018];20(5):110-28. Disponible en: <http://www.revmultimed.sld.cu/index.php/mtm/article/viewFile/392/625>
4. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 2014 [acceso 05/06/2018];24(10):R453-R462. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982214003261>
5. Jaramillo Juárez F, Valdivia Flores A. Fundamentos de estrés oxidativo celular. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. Primera edición. 2016 [acceso 03/04/2018]. Disponible en: www.uaa.mx/direcciones/dgdv/editorial/
6. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes C, Valko M, *et al*. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*. 2017 [acceso 24/04/2018];38(7):592-607. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614717300974>
7. Borges BE, Brito EB, Fuzii HT, Baltazar CS, Sá AB, Silva CI, *et al*. Human papillomavirus infection and cervical cancer precursor lesions in women living by Amazon rivers: investigation of relations with markers of oxidative stress. *Einstein (São Paulo)*. 2018 [acceso 18/01/2019];16(3):eAO4190. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082018AO4190>

8. Kalyanaraman B, Hardy M, Podsiadly R, Cheng G, Zielonka J. Recent developments in detection of superoxide radical anion and hydrogen peroxide: opportunities, challenges, and implications in redox signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2017 [acceso 15/05/2018];617:38-47. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5318280/>
9. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox biology*. 2017 [acceso 17/04/2018];11:613-9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231716303196>
10. Antunes F, Brito P. Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. *Redox biology*. 2017 [acceso 12/10/2018];13:1-7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231717301891>
11. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox biology*. 2015 [acceso 17/04/2017];6:183-97. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231715000804>
12. Looi ML, Dali AZHM, Ali SAM, Ngah WZW, Yusof YAM. Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. *European Journal of Cancer Prevention*. 2008;17(6):555-60. DOI: [10.1097/CEJ.0b013e328305a10b](https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328305a10b)
13. Hiraku Y, Tabata T, Ma N, Murata M, Ding Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Sci*. 2007 [acceso 15/04/2018];98(7):964-972. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1349-7006.2007.00497.x>
14. Kania N, Basri S, Thalib I, Suhartono E. Oxidative Stress Parameters as A Marker From Several Pathological Conditions in Cervical Mucus. *IJCPR*. 2017 [acceso 13/06/2018];8(3):210-4. Disponible en: www.ijcpr.com doi:[10.25258/ijcpr.v8i03.9205](https://doi.org/10.25258/ijcpr.v8i03.9205)
15. Dasari S, Wudayagiri R, Valluru L. Efficacy of treatment on antioxidant status in cervical cancer patients: A case control study. *Free Radicals and Antioxidants*. 2013 [acceso 20/07/2018];XXX:1-6 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fra.2013.05.004>
16. Costa A, Scholer-Dahirel A, Mechta-Grigoriou F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2014 [acceso 15/02/2018];25:23-32. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X14000042>

17. Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now?. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 [acceso 11/07/2017];75(3):637-44. Disponible en:
<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x>
18. Guerrero L, Maldonado M, Calderón JV. La paradoja del uso de antioxidantes durante el tratamiento contra el cáncer: ¿proteger al organismo de los efectos tóxicos de los antineoplásicos disminuiría la eficacia farmacológica para evitar el desarrollo del cáncer? *REB.* 2016 [acceso 10/04/2018];35(3):71-88. Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2016/reb163c.pdf>
19. Mateo K, Ortiz J, Flores H. Relación de la respuesta inmune en la infección por vph para el desarrollo de cáncer cervicouterino. *Rev méd cient.* 2015 [acceso 21/03/2018];28(2):14-20. Disponible en:
https://scholar.google.com/cu/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Relaci%C3%B3n+de+la+respuesta+inmune+en+la+infecci%C3%B3n+por+vph+para+el+desarrollo+de+cancer+cervicouterino&btnG=

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Danay Heredia Ruiz: Diseño experimental, procesamiento de la muestra, discusión de los resultados.

Manuela Herrera Martínez: Análisis y discusión de los resultados.

Douglas Fernández Caraballo: Procesamiento de las muestras y análisis estadístico.

Gladys López Ocampo: Selección y obtención de la muestra.

María Bárbara Gómez Monteagudo: Selección y obtención de la muestra.

Emilio González Rodríguez: Proveedor de reactivos y equipos de medición.