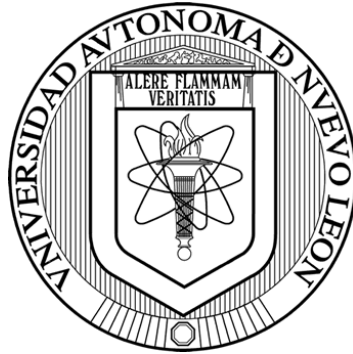


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ENFERMERÍA  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



EVALUACIÓN DE BIOMARCADOR NATURAL FLUORESCENTE PARA  
TAMIZAJE DE LESIONES ORALES POTENCIALMENTE  
MALIGNAS EN POBLACIÓN ABIERTA

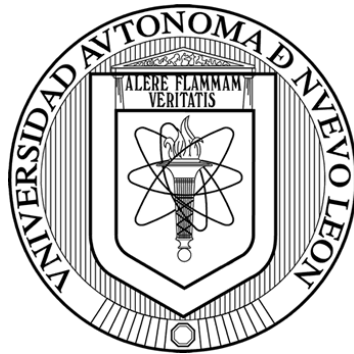
Por

MCSP. GUILLERMO CANO VERDUGO

Como requisito para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS DE ENFERMERÍA

AGOSTO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ENFERMERÍA  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



EVALUACIÓN DE BIOMARCADOR NATURAL FLUORESCENTE PARA  
TAMIZAJE DE LESIONES ORALES POTENCIALMENTE  
MALIGNAS EN POBLACIÓN ABIERTA

Por

MCSP. GUILLERMO CANO VERDUGO

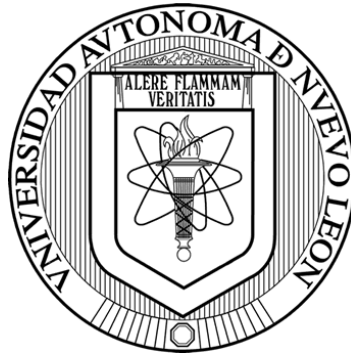
Director de Tesis

DRA. DORA JULIA ONOFRE RODRÍGUEZ

Como requisito para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS DE ENFERMERÍA

AGOSTO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ENFERMERÍA  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



EVALUACIÓN DE BIOMARCADOR NATURAL FLUORESCENTE PARA  
TAMIZAJE DE LESIONES ORALES POTENCIALMENTE  
MALIGNAS EN POBLACIÓN ABIERTA

Por

MCSP. GUILLERMO CANO VERDUGO

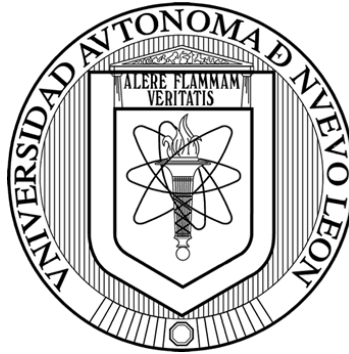
Co-Director de Tesis

DRA. MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS

Como requisito para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS DE ENFERMERÍA

AGOSTO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ENFERMERÍA  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



EVALUACIÓN DE BIOMARCADOR NATURAL FLUORESCENTE PARA  
TAMIZAJE DE LESIONES ORALES POTENCIALMENTE  
MALIGNAS EN POBLACIÓN ABIERTA

Por

MCSP. GUILLERMO CANO VERDUGO

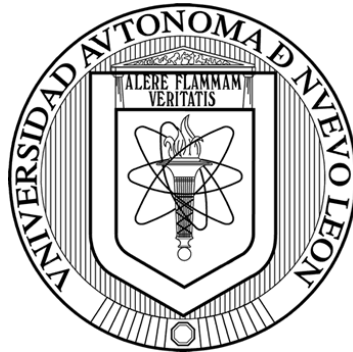
Asesor Externo

DR. CÉSAR IVÁN ROMO SÁENZ

Como requisito para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS DE ENFERMERÍA

AGOSTO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE ENFERMERÍA  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



EVALUACIÓN DE BIOMARCADOR NATURAL FLUORESCENTE PARA  
TAMIZAJE DE LESIONES ORALES POTENCIALMENTE  
MALIGNAS EN POBLACIÓN ABIERTA

Por

MCSP. GUILLERMO CANO VERDUGO

Asesor Estadístico

DRA. JEYLE ORTÍZ RODRÍGUEZ

Como requisito para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS DE ENFERMERÍA

AGOSTO, 2022

EVALUACIÓN DE BIOMARCADOR NATURAL FLUORESCENTE PARA  
TAMIZAJE DE LESIONES ORALES POTENCIALMENTE  
MALIGNAS EN POBLACIÓN ABIERTA

Aprobación de Tesis

---

Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez  
Director de Tesis

---

Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez  
Presidente

---

Raquel Alicia Benavides Torres, PhD.  
Secretario

---

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos  
1er. Vocal

---

Dra. María Aracely Márquez Vega  
2do. Vocal

---

Dra. Dabeiba Adriana García Robayo  
3er. Vocal

---

Dra. María Magdalena Alonso Castillo  
Subdirectora de Posgrado e Investigación

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca proporcionada para realizar y culminar mis estudios de doctorado.

A la directora de la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. María Guadalupe Moreno Monsiváis, por su apoyo prestado y gestionar los permisos necesarios ante las autoridades universitarias en la ejecución de la Fase experimental de este proyecto, a la Dra. María Magdalena Alonso Castillo, Subdirectora de Posgrado e Investigación, por el apoyo brindado durante mi etapa académica.

A mi directora de tesis Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez por su apoyo, paciencia y siempre voluntad en enseñarme el noble camino de la investigación. Juntos emprendimos un reto que ahora rinde frutos y mejor compañía no pude haber tenido a lo largo de estos años, ¡Infinitas gracias Dra.!.

A mi co-Director de tesis Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos, por siempre recibirme con los brazos abiertos en la Unidad de Odontología Integral y Especialidades (UOIE) del CIDICS, instruirme en la práctica la investigación científica, y dar su consentimiento y en la realización de las actividades dentro de la Unidad. De manera muy especial al MC. Arturo Abraham Cienfuegos Sarmiento por su apoyo y recepción en la UOIE.

A la Dra. Dabeiba Adriana García Robayo de la Pontificia Universidad Javeriana por su cálida recepción durante la estancia de investigación, sin duda Dra. sus aportaciones fueron de gran valor en la realización de este trabajo.

A Raquel Alicia Benavides Torres, PhD, líder de la Unidad de Investigación en Enfermería (UIE) del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), por permitirme colaborar en ese espacio de intercambio de ideas, experiencias y sobre todo aprendizaje.

Al Dr. César Iván Romo Sáenz por su apoyo constante, paciente y siempre acertado en la realización de los procedimientos de esta investigación, así como a compañeros y personal de la Unidad de Formulación de Biológicos, Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas, Laboratorio de Inmunobiología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. También de manera muy especial a la MC. Jessica M. Ramírez Villalobos por sus contribuciones a este proyecto.

A mi asesora estadística Dra. Jeyle Ortiz Rodríguez, por su ayuda en el diseño estadístico de este proyecto. También al Dr. Esteban Picazzo Palencia por sus acertados aportes metodológicos y estadísticos.

A los profesores que nos acompañaron a mis compañeros y a mí en este trayecto, que con su esfuerzo y dedicación, formaron cinco integrantes de la generación 2018-2022 del Doctorado en Ciencias de Enfermería con sentido crítico, humano y siempre en beneficio de las Ciencias de Enfermería.

A mis compañeros de generación, MCE. Lorena Yuliana Vera Alanís, ME. Daisy Amparo Aranda Sánchez, ME. Pedro González Angulo y MCE. Cynthia Berenice Rueda Sánchez, por compartir su empatía, conocimiento, amistad y colaboración. Les deseo el mayor éxito en sus proyectos personales y profesionales.

A la Dra. Ma. Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda, directora de la Facultad de Odontología, por su apoyo durante este trayecto. Es un gusto pertenecer a la institución que dirige.

Al CIDICS por su apoyo brindado durante mi etapa formativa de doctorado. En especial a la UIE y UOIE. De igual forma al personal directivo, administrativo, de intendencia y apoyo del CIDICS.

A Esther Carlota Gallegos Cabriales, PhD, por su colaboración en la conformación del marco metodológico del presente proyecto, que sin duda abrió un panorama para futuras líneas de investigación.



Al Departamento de Odontología Preventiva y Social, en especial al Dr. Jaime A. Mendoza Tijerina, Jefe del Departamento quien me apoyó incondicionalmente. También al Departamento de Formación Integral al Estudiante y Centro de Autoaprendizaje de Idiomas de la Facultad de Odontología quienes apoyaron moralmente mis estudios.

A los directores de la Facultades de Arquitectura, Facultad de Contaduría Pública y Administración, Facultad de Derecho y Criminología, Facultad de Organización Deportiva, Facultad de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, Facultad de Trabajo Social y Desarrollo Humano, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica por brindar los permisos necesarios y permitir colaborar en sus instituciones.

A la LE. Marcela A. Flores Flores, MCE. Cynthia M. Valle Iracheta, CD. Jessica G. Burelo Zavala, CD. Cinthia A. Campa del Ángel, CD. José Ricardo López Calderón, CD. Ana Sofía Guerrero García, CD. Ana Paola Santos López, CD. Esp. Ana Cristina Sánchez Salinas, MCSP. Brenda B. Tovar Jasso y LN. José Jaziel Orozco García por su gran apoyo en la ejecución de la Fase II de este proyecto. Muchas gracias.

A mi gran tutora, la Dra. Liliana Zandra Tijerina González (†), quien me brindó su total apoyo, confianza y palabras de aliento en mi formación académica y profesional. Dra. estoy seguro se encuentra festejando con nosotros.

Al personal administrativo de posgrado Lic. Eunice Liseth Rodríguez García, Lic. Consuelo Delia Jaramillo Olivas, Srita. Sandra Mancilla Montoya y Sra. Martha Elena Márquez C. por sus finas atenciones en los procesos administrativos, así como al personal de intendencia, biblioteca y tesorería a disposición de la FAEN por brindar las condiciones necesarias para cursar el programa de doctorado

A familiares y amigos, que siempre estuvieron al pendiente de mi progreso durante esta etapa, muchas gracias.

A todos los hombres y mujeres que participaron en este estudio, gracias por haber contado con su apoyo y colaborar en beneficio de la ciencia.

## **Dedicatoria**

A mi familia: mis padres, hermanos, tíos, primos, amigos, los amo. Gracias por confiar en mí.

A mis maestros y compañeros, quienes me han ayudado y acompañado en mi desarrollo como profesional y como persona. Gracias por su amistad.

A la vida, que me ha colmado de dicha y oportunidades extraordinarias.

## Tabla de Contenido

Contenido	Página
Capítulo I	
Introducción	1
Marco de Referencia	6
Método de Fluorescencia	6
Método de Fluorescencia en Biomarcadores Naturales Fluorescentes	11
Tecnología Médica	13
Tecnología Médica en Luz UV	14
Declaración STARD	16
Declaración STARD en Biomarcadores Naturales Fluorescentes y Luz UV	18
Estudios Relacionados	18
Método de Fluorescencia	19
Tecnología Médica	23
Declaración STARD	25
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28
Hipótesis	28
Capítulo II	
Metodología	30
Fase Preliminar: Diseño, Elaboración y Viabilidad del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV	30
Diseño del Estudio	30
Población, Muestra y Muestreo	30
Criterios de Inclusión	30

## Tabla de Contenido

Contenido	Página
Criterios de Eliminación	31
Instrumentos de Medición	31
Procedimiento de Recolección de Datos	31
Diseño y Elaboración	31
Biomarcador Natural Fluorescente	31
Luz UV	33
Evaluación de la Viabilidad	34
Comparación con el Estándar de Oro	34
Cultivo Celular Preliminar	34
Consideraciones de Bioseguridad	35
Plan de Análisis de Datos	38
Fase I: Experimentación del Biomarcador Natural Fluorescente y	
Luz UV ( <i>in vitro</i> )	40
Diseño del Estudio	40
Población, Muestra y Muestreo	40
Criterios de Inclusión	40
Criterios de Exclusión	40
Criterios de Eliminación	40
Instrumentos de Medición	41
Procedimientos de Recolección de Datos	41
Biomarcador Natural Fluorescente	41
Evaluación de la Actividad Citotóxica	41
Cultivo Celular	41
Luz UV	42

## Tabla de Contenido

Contenido	Página
Consideraciones de Bioseguridad	43
Plan de Análisis de Datos	43
Fase II: Validación Discriminatoria del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV ( <i>in vivo</i> )	46
Diseño del Estudio	46
Población, Muestra y Muestreo	46
Criterios de Inclusión	46
Criterios de Exclusión	47
Criterios de Eliminación	47
Instrumentos de Medición	47
Procedimiento de Recolección de Datos	47
Capacitación del Personal de Apoyo	47
Selección de los Participantes y Procedimientos	48
Confirmación Diagnóstica	50
Consideraciones Éticas	51
Consideraciones de Bioseguridad	52
Plan de Análisis de Datos	55
Capítulo III	
Resultados	57
Biocompatibilidad del Biomarcador Natural Fluorescente	57
Sensibilidad y Especificidad del Biomarcador Natural Fluorescente	58
Criterios de Discriminación por el Biomarcador Natural Fluorescente	60
Características de Determinan Padecer Lesiones Orales Potencialmente Malignas	62

## Tabla de Contenido

Contenido	Página
Capítulo IV	
Discusión	68
Limitaciones del Estudio	71
Conclusiones	72
Recomendaciones	75
Referencias	77
Apéndices	93
A. Consentimiento Informado	94
B. Encuesta Perfil Sociodemográfico y de Salud	97
C. Lista de Verificación del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV	99
D. Oficios para Solicitud de Realización de la Fase II: Validación Discriminatoria del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV ( <i>in vivo</i> )	100
E. Resultados Fase Preliminar	111
F. Glosario	114

## Lista de Tablas

Tabla	Página
1. Distribución de Participantes por Factores de Riesgo	61
2. Distribución de Participantes con Presencia de Fluorescencia a la Aplicación del Biomarcador Natural por Sitio de Fluorescencia	62
3. Distribución de Participantes Evaluados mediante PCR por Tipo de Antecedentes Heredofamiliares de Cáncer	65
4. Distribución de Participantes Evaluados mediante PCR por Tipo de Enfermedad Preexistente	67

## Lista de Figuras

Figura	Página
1. Espectro Electromagnético	8
2. Arquitectura para la Investigación de Pruebas Diagnósticas en Biomarcadores Naturales Fluorescentes y Luz UV	18
3. Diagrama de Flujo de la Fase Preliminar: Diseño, Elaboración y Viabilidad del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV	39
4. Diagrama de Flujo de la Fase I: Experimentación del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV ( <i>in vitro</i> )	45
5. Diagrama de Flujo de la Fase II: Validación Discriminatoria del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV ( <i>in vivo</i> )	56
6. Citotoxicidad del extracto metanólico de <i>C. officinalis</i> contra células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC <sup>®</sup> PCS-201-018 <sup>™</sup> )	59
7. Fotografías de la evaluación mediante microscopía óptica del biomarcador natural fluorescente y luz UV a 4, 10 y 40X	59
8. Análisis del densitograma del extracto metanólico de <i>C. officinalis</i> en células tumorales y normales	60
9. Amplificación del Gen de VPH mediante PCR	63
10. Distribución de participantes positivos y negativos ante pruebas confirmatorias de PCR	63
11. Participantes con presencia de fluorescencia que declaran fumar y beber alcohol	65
12. Participantes con presencia de fluorescencia que declaran fumar y beber alcohol al menos una vez por semana	66
13. Participantes con presencia de fluorescencia que cuentan con diagnóstico médico de alguna enfermedad	66



## Lista de Figuras

Figura	Página
14. Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV	111
15. Luz UV de 12V, biomarcador natural fluorescente y agua tónica empleadas como estándar de oro	112
16. Evaluación de la viabilidad comparando contra el estándar de oro	112
17. Células Observadas al Microscopio en Pruebas de Viabilidad	113
18. Placas de cultivo de 6 pozos empleadas en el experimento	113

## Resumen

MCSP. Guillermo Cano Verdugo  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Enfermería

Fecha de Graduación: Agosto, 2022

**Título del Estudio:** EVALUACIÓN DE BIOMARCADOR NATURAL FLUORESCENTE PARA TAMIZAJE DE LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNAS EN POBLACIÓN ABIERTA

Número de páginas: 114

Candidato para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias de Enfermería

**LGAC:** Sexualidad responsable y prevención de ITS-VIH/SIDA

**Propósito y Método del Estudio:** El propósito del estudio fue determinar la capacidad de un biomarcador natural fluorescente en el tamizaje de lesiones orales potencialmente malignas, y probarlo en población general. Para ello, se emplearon extractos de metanol de *C. officinalis* que fueron obtenidos por el método Soxhlet continuo, tras lo cual se liofilizaron y se suspendieron en solución de Hank's. Se evaluó la citotoxicidad de los extractos frente a HGF (ATTC® PCS-201-018™) fibroblastos gingivales humano mediante el ensayo de reducción con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio. Se ensayaron concentraciones no citotóxicas contra el HGF, frente a HeLa (ATTC® CCL-2™) células de cáncer cervical, y frente a HT-29 (ATCC® HTB-38™) células de cáncer de colon, solas y en co-cultivo con el HGF para identificar su selectividad frente a las células tumorales mediante fluorescencia y fueron evaluadas con el software ImageJ. Se observó que 250 µg/mL (mayor concentración no citotóxica para el HGF) del extracto mostró una selectividad significativa ( $p < .05$ ) para las células HT-29 sobre el HGF. También se observó selectividad hacia las células tumorales en co cultivos de células HT-29 o HeLa con HGF. Posteriormente, fue probado en población general aplicándose a 305 participantes, y se les tomó muestra con citobrush a aquellos participantes que presentaran fluorescencia a la aplicación para su posterior análisis molecular por PCR.

**Contribución y Conclusiones:** Los resultados demostraron la viabilidad del uso de extractos de *C. officinalis* para la identificación temprana de lesiones orales potencialmente malignas, dada su selectividad para las células cancerosas y la ausencia de toxicidad para las células normales (HGF) a 250 µg/mL, tras un minuto de exposición. En la aplicación en población abierta del biomarcador natural fluorescente y luz UV, el 20.62% presentaron fluorescencia, de los cuales 68.25% dieron positivo a VPH oral ante las pruebas de PCR. También se encontró que factores de riesgo como fumar tabaco, beber alcohol y presencia de comorbilidades fueron factores significativos ( $p < .05$ ) para la presencia de lesiones orales a través del empleo del biomarcador natural fluorescente y luz UV, sin embargo el contar con antecedentes heredofamiliares de cáncer no ( $p = .314$ ). También, se identificó que el sitio de fluorescencia influye significativamente en la presencia de VPH oral ( $p < .05$ ), siendo la mucosa y vestíbulo bucal el sitio más prevalente. Se demuestra que biomarcadores naturales como los extractos de metanol de *C. officinalis* pueden ser utilizados en la práctica clínica habitual para la identificación temprana de lesiones orales potencialmente malignas, dada su compatibilidad con las células tumorales en estudios *in vitro*. Pueden representar una

alternativa para una detección rápida y sencilla, especialmente por parte del personal sanitario en regiones donde los servicios médicos carecen de equipos de alta tecnología, constituyendo una pauta importante para reducir sus posibles neoplasias derivadas, incluyendo el cáncer oral, y por consiguiente su tasa de mortalidad. Los hallazgos de este estudio son de gran importancia, ya que dan una visión holística del fenómeno de la prevención, evidenciando un aporte a la comunidad científica para la promoción de la salud enfocada a prevenir lesiones orales potencialmente malignas. Se constata el potencial que puede tener el presente proyecto en una colaboración inter y multidisciplinaria donde personal de enfermería pueda contribuir en el cuidado del usuario hacia una conducta promotora de salud y sexualidad responsable, odontología en la inspección de tejidos orales, ciencias biológicas en el mejoramiento biotecnológico de los futuros biomarcadores fluorescentes orales, ciencias sociales para identificación , canalización y acompañamiento de casos y demás ciencias. Esto, dejando de lado la idea que salud compete solo a las ciencias médicas y se confirma el hecho que todos los profesionales pueden contribuir en beneficio de la población y en la disminución de los índices de lesiones orales potencialmente malignas.

**FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS:** \_\_\_\_\_

## **Capítulo I**

### **Introducción**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud ([OMS], 2005) el término de lesiones potencialmente malignas describe todas aquellas alteraciones en la mucosa oral que anteceden a lesiones malignas, pueden presentarse en cualquier momento de la vida, constituyendo el único indicio de alguna enfermedad. Las lesiones potencialmente malignas tienden a ser difusas y confundirse con la coloración normal de la mucosa bucal, pudiendo pasar inadvertidas ante la inspección clínica del personal de salud (Kala et al., 2018; Warnakulasuriya, 2018). Si éstas no se detectan a tiempo pueden evolucionar a cáncer oral y metastatizar a ganglios linfáticos, mama, pulmón y riñón, por mencionar algunos (Chaitanya et al., 2016; Winer et al., 2019).

Las lesiones orales potencialmente malignas cuentan con una incidencia creciente del 4.47% a nivel mundial (Mello et al., 2018), motivo por el cual no se encuentran dentro de los programas preventivos de salud, sin embargo, el 70% de los pacientes llega a las instituciones de salud con lesiones en etapas avanzadas, de ahí la importancia de su detección precoz (Chaitanya et al., 2016; Smith et al., 2017; Liuzzi et al., 2009). Existe un gran número de factores de riesgo que son relevantes para el desarrollo de lesiones orales potencialmente malignas, como el consumo de tabaco y alcohol, cuyas prevalencias de consumo en población general en México, son de 94.3 y 17.9% anual respectivamente ([ENSANUT], 2018).

Aunado a lo anterior, antecedentes familiares de cáncer, ser mayor de 50 años y heridas en boca con más de dos semanas de evolución, han sido descritos como factores de riesgo en su desarrollo (Chaitanya et al., 2016). Otro factor de riesgo es la presencia de virus en cavidad oral. Entre estos se, encuentra el Virus del Epstein-Barr (VEB), Polyoma BK, Citomegalovirus (CMV), Herpes Simple (VHS-1) y principalmente el Virus del Papiloma Humano (VPH) (Young et al., 2015).

El VEB es un virus proveniente de la familia de los herpesvirus y se ha relacionado al desarrollo de cáncer al poder infectar células epiteliales y de la línea linfóide, con especial tropismo por células *B*. Se transmite por saliva, durante el beso, por sangre, contacto sexual, trasplantes y por vía perinatal (Vranic et al., 2018). El virus BK es un miembro de la familia *Polyomaviridae*, aislado por primera vez en 1971 y se ha relacionado en coinfección con otros virus en el cáncer de laringe, orofaringe y de cavidad oral (Drop et al., 2017).

El CMV es un género de herpesvirus, cuyas vías de transmisión son infección congénita, perinatal, y posnatal, transfusiones sanguíneas, y trasplante de órganos. El hacinamiento y la falta de higiene favorecen su transmisión, se ha relacionado a varios tipos de cáncer como el oral, de mama y cervicouterino (Geisler et al., 2019). El VHS-1 es considerado una infección contagiosa, frecuente y endémica en todo el mundo. Se adquiere durante la infancia y dura toda la vida. La mayoría de las infecciones por VHS-1 son herpes labiales, suele ser asintomática, pero en algunos casos causan molestias mayores. Su presencia se ha relacionado con cáncer de mama, colorrectal, y oral (Louvanto et al., 2017; Tiwari et al., 2017).

Con respecto al virus del papiloma humano (VPH), estudios epidemiológicos indican que la infección oral por este virus aumenta de forma significativa respecto a la edad, se evidenció que es mayor en hombres (43%) que en mujeres (17.5%) (Bologna-Molina et al., 2006; ; Chaturvedi et al., 2015; D'Souza et al., 2016), causando el 5.2% de las neoplasias en seres humanos, se estima que cerca del 80% de las personas con vida sexual activa han estado expuestas al virus en el transcurso de su vida (Kennedy, 2016; Louie et al., 2015; Louvanto et al., 2017; Pacheco-Domínguez, 2019; Young et al., 2015).

La infección por VPH en cavidad oral está asociada a comportamientos sexuales de riesgo, principalmente sexo orogenital sin protección. Sin embargo, el contacto boca a boca y la transmisión vertical son también mecanismos de transmisión de este virus a

la cavidad oral (Slama et al., 2015; Venegas-Reyes et al., 2011). Los VPH se clasifican de alto, intermedio y bajo riesgo, dependiendo de su asociación con neoplasias. Los tipos virales 16 y 18 son considerados de alto riesgo y se relacionan con cáncer de cavidad oral y orofaringe, mientras que los tipos virales 6 y 11 son considerados de bajo riesgo y se relacionan con lesiones benignas (Mineta et al., 1998). La infección oral por VPH de alto riesgo se asocia con el 35% de los cánceres de la cavidad oral y orofaringe, el cual ha incrementado su prevalencia 225% en los últimos 25 años, cifra que demanda una puesta en marcha de acciones para su diagnóstico oportuno (Cháirez Atienzo et al., 2015; Gipson et al., 2018).

Por otro lado, varios autores declaran la viabilidad de realizar pruebas de detección de lesiones orales potencialmente malignas como predictor de infección del VPH oral-genital (Winer et al, 2019), al haber concordancia entre ambas (Peixoto et al, 2011), misma que se ha reportado hasta en un 91% (Sánchez-Vargas et al., 2010). Visalli et al. (2016), indican que, si se realiza una prueba de detección de lesiones orales potencialmente malignas, se podría evitar en primera instancia las pruebas de detección del VPH genital convencionales y, por consiguiente, las experiencias desagradables como el temor, miedo y/o vergüenza en el caso del Papanicolaou; y estrés y angustia, en el caso de los hombres en la detección clínica de lesiones verrugosas.

Lo anterior muestra las bondades de la detección de lesiones orales potencialmente malignas a través de métodos de detección que cuenten con aceptación en la población, fiabilidad, e inocuidad (Bustamante-Ramos et al., 2015; Duanes, 2018; Maguiña et al., 2018; Obiri-Yeboah, 2017; Olaza, 2018; Roca Brito, 2018; Smith et al., 2017; Soto, 2011). Con respecto a las pruebas de detección de lesiones orales potencialmente malignas, en Rumania, existe un visualizador de autofluorescencia del tejido de lesiones orales potencialmente malignas. Cuenta con sensibilidad del 94.44% y una especificidad del 100% para discriminar las lesiones en mucosa. Permite una

determinación de margen simple, sin embargo, argumentan la necesidad de mejorar costos en herramientas de luz UV (Cânjău et al., 2018).

En México, existe una patente de métodos de detección de lesiones orales, la cual emplea clasificadores de células activadas fluorescentes, sondas de ácido nucleico y micro gránulos. Los estudios los realizan personal experto en laboratorio, por lo que toman largo período de tiempo en su análisis y son de alto costo. Respecto a la fuente de luz fluorescente empleada, los autores declaran que es una lámpara de tipo comercial, discutiendo la necesidad de innovar en nuevos emisores de luz con características específicas dirigidas a las condiciones de la cavidad oral (Barraza & Ozbun, 2012).

Los métodos de detección de lesiones orales potencialmente malignas arriba mencionados han demostrado contar con la misma efectividad y veracidad que los métodos de detección de VPH genital (Tsao et al., 2016), no ser invasivos y más aceptables en la población (Chai et al., 2015), y pueden ser confirmadas con pruebas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para detectar la presencia del material genético (ADN) de un virus a través de la obtención de una muestra por un cepillado, sin embargo, de acuerdo con lo expuesto por The Oral Cancer Foundation (2019), los métodos de detección actuales no han tenido el impacto deseado debido a la falta de difusión, conocimiento, usabilidad y alto costo; por ello afirman, que es imprescindible la necesidad de crear métodos de detección aceptables, prácticos y de costo accesible.

De acuerdo con lo anterior, varios autores indican que, realizar métodos de detección de lesiones orales potencialmente malignas pueden permitir el tamizaje de una población completa (Javaid et al., 2016); que deben estandarizarse y validarse, por lo que deben efectuarse más estudios para demostrar su precisión, eficacia, facilidad de uso y rentabilidad (Dobri et al., 2019; Donà et al., 2017; Mikkonen et al., 2016); otros argumentan que los métodos de detección posean alta sensibilidad, especificidad y precisión para detectar la mayoría de las lesiones de alto riesgo, que tengan estabilidad,

alto impacto, y ayude a la detección rápida y oportuna (Rindal et al., 2019; Sacco et al., 2017; Tiwari et al., 2017; Wood et al., 2017).

Otros autores destacan la imperiosa necesidad de crear métodos de detección de lesiones potencialmente malignas que sean económicos, que empleen elementos de fácil acceso, procesos y lugares de fabricación asequibles, que cuenten con amplia vigencia de uso, y con capacidad de almacenamiento a temperatura ambiente, esto para disminuir costos y elevar rendimiento del producto. Estas características generarían el interés para ser empleadas por el personal de salud, convirtiéndolas en atractivas para ser usadas como métodos de detección (Demopoulos, 2018; Donà et al., 2019, Kepka et al., 2019; Pampena et al., 2019).

Por lo tanto, el pronóstico del potencial de malignización depende del grado de displasia a nivel histológico, de ahí la importancia de realizar la detección de lesiones orales potencialmente malignas con ayuda de biomarcadores que reaccionen con el epitelio bucal y la saliva (Kepka et al., 2019). De esta manera, permitiría identificar de forma temprana la presencia de una lesión tanto potencialmente maligna como maligna, colaborando a la detección precoz y la oportuna derivación. Esto es de suma importancia para mejorar la supervivencia y reducir el retraso en el diagnóstico, ya que, desafortunadamente, casi la mitad de los cánceres orales se detectan en estadios avanzados (Demopoulos, 2018; Donà et al., 2019).

Además, es de vital importancia que los profesionales de la salud (enfermería, odontología, medicina y profesionales de la salud pública en general) en una colaboración de carácter inter y multi disciplinario, así como la población en general, estén entrenados en la detección temprana de cualquier lesión de la cavidad oral, más aún cuando se trata de lesiones con potencial maligno que pudieran ser originadas por prácticas sexuales orales, las cuales han sido reportadas en más del 85% de los adultos sexualmente activos de acuerdo con datos del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades ([CDC], 2018). De ahí que es altamente recomendable la consejería al



momento de la realización de dicho procedimiento, donde la disciplina de enfermería fungiría un rol clave en la promoción de la sexualidad responsable y prevención de ITS.

Por lo que el propósito del presente estudio fue desarrollar un biomarcador natural fluorescente en forma de solución, y utilizar luz UV para su revelado, con características no intrusivas y de menor costo que los disponibles hasta hoy, y probarlo en población general.

### **Marco de Referencia**

El método de fluorescencia, tecnología médica y declaración Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies STARD, sirvieron como sustento en el presente estudio, ya que ofrecen un marco referencial para el desarrollo de un biomarcador natural fluorescente, así como los lineamientos para justificar su implementación. A continuación, se describe el método de fluorescencia, posteriormente se presenta la tecnología médica y finalmente se muestra la declaración STARD.

### ***Método de Fluorescencia***

Proviene de la rama de la física, y aborda como sustancias al ser expuestas a la acción de ciertos rayos comprendidos entre las longitudes de onda de los 400 a los 700 nm, transforman estas radiaciones emitiendo ondas luminosas de longitud de onda mayor que la de los rayos incidentes. Ha sido ampliamente empleada en el estudio de la estructura y conformación del ADN, así como de proteínas con técnicas como la transferencia de energía de resonancia (Johnson & Joannopoulos, 2018).

La espectrometría de fluorescencia también llamada fluorimetría o espectrofluorimetría, es el estudio del proceso de absorción de una muestra al ser excitada con energía electromagnética y su proceso de emisión de fluorescencia. Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de luz a la muestra bajo estudio, y captar el espectro de luz emitido con el objetivo de determinar la presencia del o los fluoróforos de interés. Se le llama fluoróforos a aquellas moléculas o parte de las moléculas que tiene la capacidad de fluorescer o brillar (Johnson & Joannopoulos, 2018).

Algunos dispositivos comerciales empleados en este tipo de estudio son espectrofluorómetros, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, citómetros de flujo. El uso de la espectroscopía de fluorescencia ha sido sugerido en diversas aplicaciones médicas como son el monitoreo de cáncer en cuello uterino, sistema de fotografía de excitación de autofluorescencia para demarcar lesiones en piel de rápida proliferación celular (Gutierrez-Herrera et al., 2016).

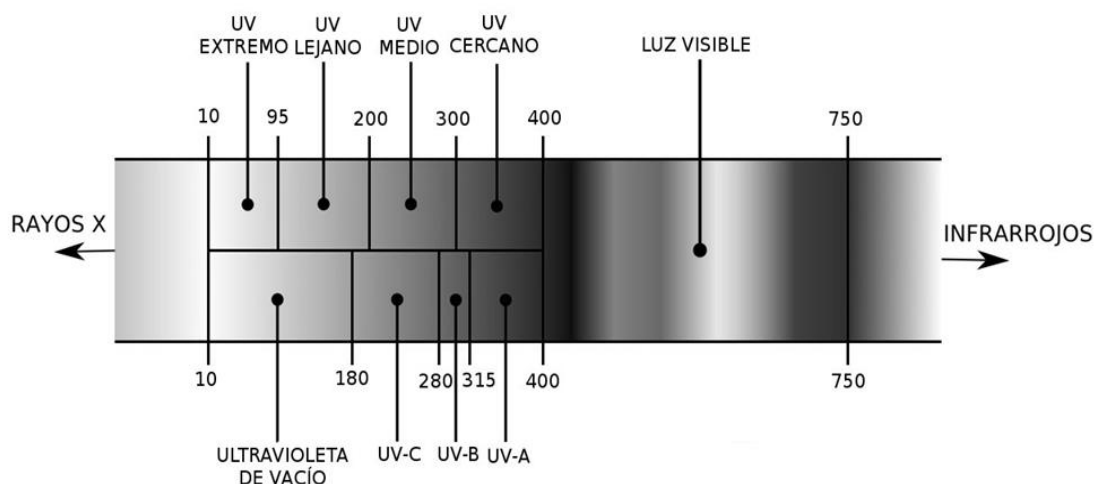
La espectroscopía de fluorescencia, como técnica de diagnóstico de alteraciones patológicas en organismos, mide la radiación electromagnética que emana de la materia o que interactúa con ella. Su aplicación en áreas de la medicina se encuentra en la región del espectro ultravioleta. Se emplea para el análisis de los cambios bioquímicos y morfológicos de los tejidos *in vivo* y *ex vivo*. Se ha propuesto como herramienta auxiliar en el diagnóstico médico de enfermedades como diabetes, fibrosis hepática, cáncer, entre otras. En diferentes investigaciones científicas la espectroscopía de fluorescencia ha presentado una alta sensibilidad y especificidad cuando es comparada con la histopatología de los tejidos (Gramotnev & Bozhevolnyi, 2014).

Los principios de la espectroscopía de fluorescencia se basan en investigar la localización celular de una proteína en células o tejido, que pueden estar unidos directamente a fluorocromos, los cuales son componentes de una molécula que hacen que éstas sean fluorescentes, y pueden ser utilizados conjuntamente con anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos para detectar diversas patologías (Josephson, 2018; Park et al., 2017; Li et al., 2018).

El éxito de su empleo como método diagnóstico, se basa en la capacidad de los anticuerpos para reaccionar con alta especificidad a determinadas moléculas con las cuales reaccionan emitiendo una coloración específica, conocidas como moléculas blanco. En este proceso, el anticuerpo reacciona contra un preparado biológico, el cual expone la muestra tratada a una fuente de luz de onda corta (UV o azul), esta última seleccionada por medio de un monocromador. Este es un dispositivo óptico que tiene

como función medir la composición de la luz según su distribución de longitud de onda, ya sean electromagnéticas o no a partir de una fuente emisora que produzca una amplia gama de longitudes de onda (García & Martínez, 2018).

En las últimas décadas el estudio de longitud de onda ha cobrado especial importancia en el análisis de fenómenos como bandas de energía, y vibraciones de redes. (Henry et al., 2019; Smith et al., 2019). Se mide en nanómetros (banda de 400 a 700 nm) (Figura 1), considerada como corta. Esto se conoce como espectro óptico de luz, y en medios no uniformes, puede variar con la posición componiendo la luz visible. Cuando se ve un objeto, es porque está iluminado por la luz visible. Es decir, el ser humano puede ver el cielo azul, pasto verde o una manzana porque están siendo observados en una longitud de onda de 400 a 700 nm (Smith et al., 2019; Strieth-Kalthoff et al., 2018).



*Figura 1.* Espectro Electromagnético (Maxwell, 1865).

Cuando se emplea la longitud de onda para fines diagnósticos, genera un fenómeno de fluorescencia en la molécula marcadora, que a su vez emite luz a una longitud de onda más larga (verde, amarillo o naranja), la cual puede ser cuantificada con facilidad por fotometría, o en el caso de tratarse de preparados histológicos, puede ser observada a través de un microscopio de fluorescencia. En el caso de la utilización de inmunofluorescencia como método de tinción para microscopía óptica, un anticuerpo acoplado a un fluorocromo, la fluorescencia revela la localización a nivel celular o

subcelular de la molécula diana (Sahl et al., 2017). Respecto a los requerimientos para el desarrollo de nuevas herramientas de detección, la literatura refiere la necesidad de regular la intensidad para detectar las moléculas que se desean observar, además de calibrar el elemento que emite la luz (Demchenko et al., 2009).

La inmunofluorescencia se basa en el empleo de la fluorescencia; fenómeno de la emisión de una cantidad de luz por una molécula o material (fluoróforo) después de la excitación electrónica inicial en un proceso de absorción de luz. Después de la excitación, una molécula reside durante algún tiempo en el llamado estado excitado y su emisión de fluorescencia se puede observar para detectar la molécula que se desea (Delves et al., 2017).

La longitud de onda es un fenómeno físico que comprende la distancia que recorre una perturbación periódica que se propaga por un medio en un ciclo, y también se conoce como un periodo espacial a la inversa de la frecuencia representándose con la letra griega  $\lambda$ . Mediante la longitud de onda se puede identificar la distancia recorrida del sonido y de la luz; útiles en los procesos donde se empleen estos dos elementos para estudiar su transcurso y recorrido. En las últimas décadas el estudio de la longitud de onda ha cobrado especial importancia en el análisis de fenómenos como las bandas de energía, y las vibraciones de redes. En inglés se conoce como “wavelength” y se mide en múltiplos o submúltiplos del metro en unidades del Sistema Internacional de Unidades (Henry et al., 2019; Smith et al., 2019).

Cuando se emplea la fluorescencia con fines diagnóstico, la molécula marcadora que a su vez emite luz a una longitud de onda (verde, amarillo o naranja) de los 400 a 700 nm que puede ser cuantificada con facilidad por fotometría o en el caso de tratarse de preparados histológicos, puede ser observada por medio de un microscopio de fluorescencia. En el caso de la utilización de la inmunofluorescencia como método de tinción para microscopía óptica, el fluorescente revela la localización a nivel celular o subcelular de la molécula diana (Sahl et al., 2017).

La inmunofluorescencia como técnica de tinción, puede ser utilizada en cortes de tejidos, líneas celulares cultivadas, células individuales y secreciones que contengan células en suspensión como esputo o saliva con la finalidad de analizar la presencia y distribución de proteínas, glúcidos y moléculas pequeñas tanto de origen biológico como no (Henry et al., 2019; Zhou et al., 2019). Existen varios diseños de microscopios que pueden ser utilizados para el análisis de preparados histológicos marcados por inmunofluorescencia. El más simple de todos es el microscopio de epifluorescencia, aunque también es ampliamente utilizado el microscopio confocal. También es posible utilizar varios tipos de técnicas microscópicas de alta resolución (García & Martínez, 2018).

Actualmente se cuentan con dos técnicas para emplear la inmunofluorescencia; primaria o directa y secundaria o indirecta. En la técnica primaria o directa (IFD por sus siglas en inglés) se utiliza un único anticuerpo unido químicamente a un fluorocromo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente pudiendo ser identificada al microscopio de fluorescencia como una zona brillante. Esta técnica presenta algunas ventajas respecto a la técnica indirecta; reduciendo el tiempo en su manejo, además de ser menos susceptible a falsos negativos por reacciones adversas que se pudieran presentar en la ejecución de dicha técnica en laboratorio (Zhou et al., 2019).

Por otro lado, se encuentra la técnica de inmunofluorescencia secundaria o indirecta (IFI por sus siglas en inglés), la cual es ampliamente utilizada en estudios de autoinmunidad debido a su fácil manejo y estandarización. Se basa en el reconocimiento de los anticuerpos que reconocen estructuras antigénicas celulares nativas. Hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a la molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él. Esta técnica es un poco más compleja que la primaria, se requieren más pasos, pero presenta otras bondades que la hacen usable para ciertos

tipos de estudios. Básicamente en esta técnica la fluorescencia proviene de un agente externo (Zhou et al., 2019). Respecto a los requerimientos para nuevas herramientas de detección, la literatura refiere la necesidad de regular la intensidad para detectar las moléculas que se desean observar, además de calibrar el elemento que emite la luz (Demchenko, 2009).

Respecto a la detección de lesiones orales potencialmente malignas, actualmente existen dos métodos para su realización, el raspado con citobrush y por enjuague oral que puede ser apoyado con fluorescencia. En el caso del raspado por citobrush, se toma una muestra de las capas basales de la boca junto con saliva por medio de un cepillo especial para toma de muestras en boca. En el caso de las muestras por enjuague oral, se obtienen con un líquido adicionado con fluoróforos, que puede ser enjuague bucal, agua simple o cualquier otro líquido que puede ser adicionado con algún saborizante para que sea más atractivo en la población, y que después de haber sido mezclado en la boca con la saliva se deposita en un tubo especial para su posterior análisis o directamente en la boca con las propiedades que desprendió el líquido en la boca (Gutierrez-Herrera et al., 2016).

La detección de lesiones orales mediante enjuague presenta diversas bondades, entre las cuales destacan mayor aceptación por parte del paciente al preferir emplear un enjuague saborizado y evitar la incomodidad que el raspado por citobrush pudiera ocasionar, considerándolo como una técnica viable para la detección del VPH oral y lesiones relacionadas (Abbas et al., 2019).

**Método de Fluorescencia en Biomarcadores Naturales Fluorescentes.** Los biomarcadores naturales fluorescentes aplicadas con fines médicos son preparados líquidos que pueden contener componentes orgánicos en diferentes proporciones, y que tiene como principal función hacer reacción frente a lesiones con potencial maligno cuando son refractadas ante la exposición de luz UV (Smith et al., 2017; Soto, 2011). Deben comprender elementos de tipo orgánico mismos que sean extractos naturales, con

alta pureza y en su estado más virgen. Se deberá tener estricto control de los componentes y asegurar la inocuidad de estos. Las cantidades exactas que llevará solo podrán ser obtenidas mediante ensayos de prueba y error donde se obtengan las proporciones ideales (Lin et al., 2020).

Se deberá considerar el aspecto visual al momento de la realización, ya que las tonalidades opacas a turbias serán consideradas no atractivas. El sabor deberá ser agradable, encontrando un balance entre el sabor dulce, amargo y ácido. Por otro lado, un olor como de cáscara de limón, menta o algún aroma suave será recomendado (Saccomano et al., 2021; Wang et al., 2020). Respecto a su desinfección, deberá ser esterilizada por filtración a 22  $\mu\text{m}$  para asegurar la seguridad de su composición, y posteriormente guardada en envases de vidrio de tapa hermética. Se recomendará un máximo de seis meses para almacenar los biomarcadores naturales fluorescentes propuestos (Saccomano et al., 2021).

Los futuros biomarcadores naturales fluorescentes deberán ser probadas *in vitro* previo a su uso *in vivo* bajo condiciones controladas, con ayuda de luz UV de carácter comercial empleada como estándar de oro o gold standard, término utilizado para definir aquellas pruebas realizadas para verificar el correcto funcionamiento de un aparato (Lin et al., 2020; Zou et al., 2018). Deberá compararse el biomarcador propuesto contra alguna formulación comercial y registrar los resultados obtenidos para su posterior comparación (Wang et al., 2020), además, deberán ser evaluadas a través de cultivos celulares en células comercializadas que tienen como finalidad promover su crecimiento bajo condiciones controladas en el laboratorio, para posteriormente analizar los efectos del biomarcador natural fluorescente bajo microscopía óptica apoyado con fluorescencia que cuenta con los suficientes aditamentos para observar los cultivos celulares y documentarlos fotográficamente. Las células propuestas para su análisis *in vitro* son HeLa (ATTC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>): células de cáncer cervical, HT-29 (ATCC<sup>®</sup> HTB-38<sup>™</sup>): células

de cáncer de colon y HGF (ATTC<sup>®</sup> PCS-201-018<sup>™</sup>): fibroblastos gingivales humanos como control (Lin et al., 2020).

Para medir el grado en que la fórmula fluorescente indica su efectividad predictiva se deberá medir la especificidad, la cual es la idoneidad que presenta la fórmula fluorescente para estimar los casos negativos en individuos sanos, de tal manera que determina efectivamente la ausencia de lesiones orales potencialmente malignas en sujetos sanos. Los biomarcadores naturales fluorescentes realizados podrán ser combinadas con solución Hank's para su empleo, la cual es una solución salina balanceada que es utilizada en el cultivo de las células ayudando a mantener un pH fisiológico (Saccomano et al., 2021).

### ***Tecnología Médica***

Tecnología médica, sanitaria o de la salud, comprenden una extensa variedad de productos y servicios que tienen como finalidad el cuidado a la salud, pueden ser herramientas o aparatos que diagnostican, vigilan, detectan o tratan enfermedades y condiciones específicas en las personas. Estas formas de tecnología tienen como principal reto, mejorar la calidad de la atención médica por parte del personal de salud desde una visión multidisciplinaria y hacer más eficientes los resultados a los pacientes a través de un diagnóstico precoz, además de centrarse en la reducción de costos (Gipson et al., 2018).

En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ante su constante búsqueda por el bien sanitario de la población en todo el mundo, colabora con instancias afiliadas que, en conjunto, se enfocan en el acceso e innovación a medicinas y otras tecnologías médicas, fortaleciendo la labor científica al colaborar con diversas ramas del área de la salud. Lo anterior, se encamina en un programa de cooperación trilateral, que promueva y fortalezca los dispositivos de detección de enfermedades que puedan emplearse en regiones sin la infraestructura apropiada, protegiendo la propiedad intelectual y los derechos que de las mismas emanan. Dichas instituciones son la World



Intellectual Property Organization (WIPO por sus siglas en inglés) y la World Trade Organization (WTO por sus siglas en inglés) (WHO, 2016).

Respecto a las tecnologías empleadas como técnicas de diagnóstico y detección, se ha hecho énfasis en el uso de ciertos fluidos corporales, como orina, heces y saliva para la detección de enfermedades en el cuerpo. Específicamente la saliva, ha sido catalogada como gran aliada tecnológica en la detección de enfermedades, demostrando ser un fiel indicador para determinar el estado de salud de las personas mediante el diagnóstico de enfermedades infecciosas y de una forma mínimamente invasiva (Gipson et al., 2018).

Específicamente en luces UV con fines médicos, la tecnología médica cobra vital importancia puesto que se establecen consideraciones en cuanto a materiales, calibre de cables, voltajes de luz, número de focos LED, peso sugerido, fin deseado, y estética. A partir de este marco, se realizará la luz UV siguiendo los lineamientos antes mencionados (Gipson et al., 2018).

**Tecnología Médica en Luz UV.** La luz UV empleada en biomarcadores naturales fluorescentes con fines médicos es considerada una herramienta que tiene como finalidad irradiar una fuente de luz de onda corta. Las luces UV con fines de detección a nivel oral debe comprender una onda electromagnética entre los 400 a 700 nm para considerarse un método de examen no invasivo y no destructivo. Además, ser construidas mediante un material ligero como el plástico para tener una mejor ergonomía, y a la vez resistente para soportar el proceso de limpieza con elementos desinfectantes. Es recomendable luces UV inalámbricas por su fácil manejo. En cuanto al tamaño, la literatura recomienda que, si va a ser empleada a nivel oral, se recomienda sea delgado y largo, que permita ser introducida a la cavidad oral sin tocar la superficie bucal. Por otro lado, los sistemas de energía recargables son menos costosos en comparación con la reposición de baterías de un solo uso (Aziz et al., 2019; Zou et al., 2018).

Respecto a la fuente de luz, se utilizó la de tipo LED (Light Emitting Diode), que en español significa “Diodo Emisor de Luz”, el cual es un elemento capaz de recibir una corriente eléctrica moderada y emitir una radiación electromagnética transformada en luz de consumo reducido y altamente eficiente, para lo cual se utilizará LED UV (luz ultravioleta) de 5 mm. y 12 V, en su interior cuenta con tubos absorbentes de radiación convirtiéndola en luz visible, formándose de un tono púrpura o lila sensible al ojo humano (Park et al., 2017; Li et al., 2018). La estética deberá tomarse en cuenta al considerar ocultar los cables de la vista del usuario, dejando por fuera solo la parte activa (Zou et al., 2018).

En cuanto a las pruebas para determinar la funcionalidad de la luz UV, se deberán realizar pruebas *in vitro* previas al uso *in vivo*, con la finalidad de demostrar su funcionalidad. Dichas pruebas deberán ser conducidas bajo condiciones controladas, en un test de referencia o estándar de oro (Lin et al., 2020; Zou et al., 2018). Por último, deberá ser considerada la finalidad de la luz UV, en este sentido, una luz que será empleado para fines de detección será diferente a una con fines de desinfección, o con fines terapéuticos (Aziz et al., 2019).

Actualmente, existen fuentes de luz UV validadas como lo son VELscope<sup>®</sup>, el cual es un dispositivo de mano de onda corta que integra un sistema de examen de la mucosa oral para la detección temprana de una amplia variedad de enfermedades orales, incluyendo el pre-cáncer y el cáncer oral. Cuenta con amplia sensibilidad y especificidad, sin embargo, es de elevado costo, y dirigido únicamente al gremio odontológico (Cânjău et al., 2018). Por otro lado, Lane et al. (2006), cuentan con un dispositivo manual que facilita la visualización directa de la fluorescencia de la cavidad bucal para la detección de lesiones precancerosas y cancerosas tempranas de alto riesgo empleando luz de onda de 400 a 460 nm, sin embargo, consideran la necesidad de un entrenamiento profundo al momento de utilizar la herramienta.

También se han empleado sondas de fibras ópticas fluorescentes con espectros de emisión de 350 nm para medir fluorescencia en tejidos orales como es el caso de Pavlova et al. (2009), quienes emplearon un dispositivo alojado en un carro móvil de tamaño mediano, como fuente de luz una lámpara de xenón de 75 W y dos filtros que permiten seleccionar doce longitudes de onda. Contó con alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, no era de carácter portátil, dificultando su desplazamiento. Simonato et al. (2019), emplearon el dispositivo de visualización por fluorescencia de tejidos orales EVINCE<sup>®</sup>, que emite luz en longitud de onda de 400 nm a través de un sistema de LEDs, y permite la observación de la autofluorescencia a través de un filtro óptico vinculado. En su empleo encontraron zonas bien delimitadas, sin embargo, declaran la necesidad de ser utilizado solamente por personal especializado.

Cabe resaltar, que los dispositivos antes mencionados proporcionan por si solos fluorescencia a los tejidos permitiendo la discriminación de áreas neoplásicas sin la necesidad de herramientas adicionales. Por otro lado, los biomarcadores naturales fluorescentes requieren la activación de luz UV de onda corta al ser la fuente principal de discriminación patógena en conjunto con el biomarcador natural fluorescente, misma que debido a su espectro electromagnético, y la duración de uso, es no dañina al cuerpo (Cânjău et al., 2018; Lane et al., 2006; Pavlova et al., 2009; Simonato et al., 2019).

### ***Declaración STARD***

Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD), es una declaración que surge en 2005, bajo la justificación que las nuevas pruebas de diagnóstico no suelen evaluarse tan rigurosamente como los medicamentos nuevos. Ante tal problemática, se han establecido una serie de lineamientos con la finalidad de comprender completamente los peligros y beneficios de la nueva prueba a ser introducida (Gludd & Gludd, 2015).

La declaración STARD divide la investigación de pruebas diagnósticas en cuatro fases también llamada arquitectura de la investigación diagnóstica (Figura 2). Así

mismo, se propone una lista de verificación y un diagrama de flujo de reclutamiento de pacientes. La lista de verificación activa STARD incluye específicamente la prueba índice o las especificaciones y procedimientos en estudio (pruebas de referencia y estándares de oro, tecnología y procedimientos, métodos y tiempo de prueba, experiencia del operador, diagnóstico de umbral, enmascaramiento), introducción, métodos, resultados y sección de discusión (Gludd & Gludd, 2015).

Los lineamientos de STARD recomiendan que la presentación de la información se introduzca a través de diagramas de flujo del número de participantes que cumplan con los criterios de selección y que aceptan o no las pruebas y estándar de referencia. En la investigación de pruebas diagnósticas, gran parte de su validez y calidad internas depende de los métodos y objetos de aplicación de las pruebas y patrones de referencia estudiados. Por lo tanto, estos son elementos que tanto los revisores como los lectores reconocerán al tomar una decisión o evaluar la calidad del original (Gludd & Gludd, 2015). Aunque es más típico en diagnóstico por imagen, laboratorio y otros campos de investigación, la declaración STARD es ampliamente aplicable a toda la variedad de instrumentos diagnósticos nuevos. Los ensayos aleatorios son la mejor forma de comparar intervenciones y evaluar los efectos potenciales de la introducción de pruebas de diagnóstico.

Gludd y Gludd (2015), proponen una arquitectura para la investigación de pruebas diagnósticas paralela a las fases establecidas en la investigación de fármacos. Dicha propuesta consta de cuatro etapas:

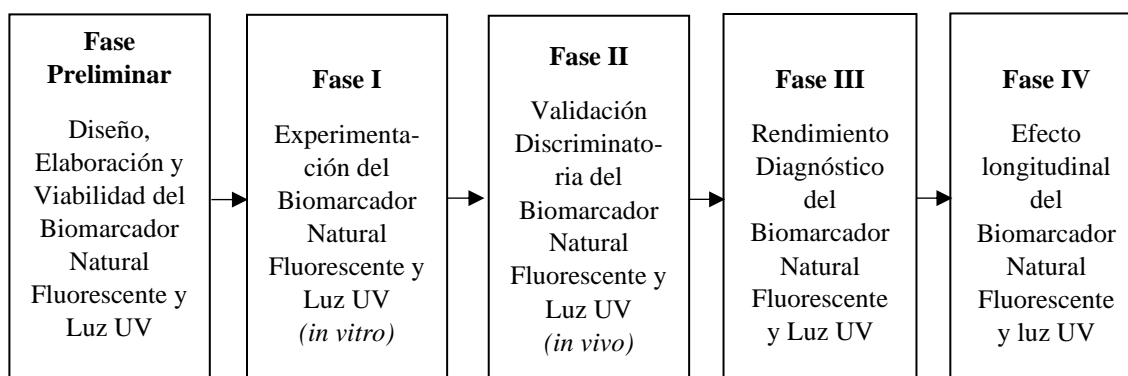
- Primera fase: Experimentar el uso del método propuesto a través de estudios observacionales.
- Segunda fase: Validar la precisión del diagnóstico a través de ensayos clínicos.
- Tercera fase: Determinar las consecuencias clínicas de la introducción de pruebas de diagnóstico mediante ensayos aleatorizados.

- Cuarta fase: Determinar el efecto de utilizar la vigilancia en estudios de cohortes grandes para introducir nuevas pruebas de diagnóstico en la práctica clínica.

En la construcción de su arquitectura de pruebas diagnósticas, Gludd y Gludd (2015), resaltan que los peligros y beneficios de las pruebas de diagnóstico deben evaluarse completamente antes de su uso en la práctica clínica, además, recomiendan que la evaluación se realice en cuatro etapas para reflejar el proceso de evaluación de nuevos tratamientos.

### **Declaración STARD en Biomarcadores Naturales Fluorescentes y Luz UV.**

De acuerdo con las fases propuestas por Gludd y Gludd (2015), la fase I correspondería a experimentar el biomarcador natural fluorescente y luz UV en ensayos observacionales *in vitro*. La fase II, en validar discriminatoriamente el biomarcador natural fluorescente y luz UV a través de estudios clínicos *in vivo*. La fase III, en determinar las posibles consecuencias o efectos no deseados del método propuesto, y la fase IV en mantener la vigilancia del método para mejoras, cambios, etc. Cabe resaltar que para el presente estudio solo se llegó hasta la fase dos, y previo a las dos fases hay una fase preliminar en donde se desarrolló el diseño y elaboración de estos, y evaluó la viabilidad (Figura 2).



*Figura 2.* Arquitectura para la Investigación de Pruebas Diagnósticas en Biomarcadores Naturales Fluorescentes y Luz UV

### **Estudios Relacionados**

A continuación, se presentan los estudios de investigación de los conceptos

relacionados con el fenómeno de interés. Serán presentados por apartados iniciando por método de fluorescencia donde se exponen las investigaciones que emplearon biomarcadores apoyados con fluorescencia para justificar su relevancia, necesidad de establecer su biocompatibilidad a través de pruebas de citotoxicidad y rendimiento diagnóstico, y sensibilidad y especificidad mediante la determinación de la intensidad de fluorescencia en cultivos celulares.

Posteriormente se muestran los estudios relacionados con tecnología médica donde se exponen investigaciones que emplearon luz UV de onda corta para fundamentar su viabilidad, necesidad de empleo e innovación, equipos tecnológicos capaces de medir su intensidad, y determinar el sitio más frecuente de presencia de lesiones orales a través de su uso.

Por último, se muestran los estudios relacionados con el método STARD, donde se dan a conocer aquellas investigaciones donde emplearon la metodología de investigación de pruebas diagnósticas, para sustentar la importancia del establecimiento de Fases delimitadas, la relevancia de implementar un orden estricto en la investigación de nuevos métodos de detección, y determinar los factores de riesgo asociados a VPH en una Fase I inicial. Al final de cada sección, se expone una síntesis de cada uno de los de los estudios relacionados. Se incluyeron algunos estudios de áreas relacionadas debido a la escasez de literatura en el tema y al constituir las únicas investigaciones disponibles al momento.

### ***Método de Fluorescencia***

Daly et al. (2020), investigaron el uso de un sistema de tomografía de fluorescencia guiada por imágenes (igFT) para estimar la profundidad de la invasión tumoral en modelos de cáncer oral que simulan tejidos. La implementación de la tomografía óptica difusa se llevó a cabo mediante el software de elementos finitos (NIRFAST), y se habilitó con datos geométricos de la exploración quirúrgica y de imágenes de CT de haz cónico intraoperatorio (CBCT). Las simulaciones y los

experimentos caracterizaron el rendimiento de la tomografía de fluorescencia en una variedad de profundidades de invasión tumoral. Para ayudar a la visualización quirúrgica, el volumen de fluorescencia se convierte en una superficie coloreada que indica la profundidad del tumor y se superpone al video endoscópico navegado, convirtiéndose en una opción confiable, económica y aceptable en la medicina.

Dang et al. (2015), realizaron un ensayo clínico en EE.UU. donde estudiaron la detección del VPH oral en muestras de enjuague bucal, utilizando la recolección de muestras de enjuague oral junto con PCR en tiempo real para detectar los tipos de VPH 16 y 18, y muestras de PCR de reacción en cadena fluorescente de la polimerasa cebada arbitrariamente y amplificadas preferentemente para detectar una amplia gama de VPH, en pacientes con Carcinoma Oral de Células Escamosas, y pacientes sanos. Como principales resultados obtuvieron que 33% de 100 pacientes con cáncer fueron positivos para cualquier tipo del VPH oral; indicando que la detección del VPH a través de PCR de reacción en cadena fluorescente en muestras de enjuague bucal puede ser útil como herramienta de detección para detectar cánceres orales asociados al VPH oral, teniendo método para la detección del VPH tenía una sensibilidad del 33% y una especificidad del 99% ( $p < .001$ ).

Cânjău et al. (2018), evaluaron lesiones orales potencialmente malignas a través de autofluorescencia tisular, estableciendo la precisión diagnóstica, sensibilidad y especificidad del método. Para lo anterior, reclutaron 18 pacientes y fueron evaluados mediante examen oral convencional seguido de evaluación de fluorescencia visual directa. Las áreas clínicamente sospechosas detectadas se investigaron más a fondo mediante PCR. Como resultados se detectaron ocho muestras positivas para lesiones malignas. Una lesión identificada como maligna fue confirmada por PCR. Se confirmó la sensibilidad del 94.44% y una especificidad del 100% para discriminar la mucosa normal *in situ* del carcinoma o del carcinoma invasivo, en comparación con la histología. El valor predictivo positivo fue del 100% y el valor predictivo negativo fue

del 50%, con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se concluyó que el proceso realizado permite una determinación de márgenes simple y rentable, con el fin de realizar la detección y cribado de los trastornos precancerosos y cancerosos tempranos orales, sin embargo, no podría reemplazar completamente el procedimiento de histopatología.

Cicciù et al. (2019), evaluaron la eficacia clínica a través de una revisión sistemática de VELscope<sup>®</sup>, herramienta de diagnóstico aplicada a la cavidad oral empleando fluorescencia. Se incluyeron 25 publicaciones y se evaluaron manualmente. Los datos sobre la sensibilidad y la especificidad se reflejaron en un 70.19% y 65.95%, respectivamente, pero a pesar de ello algunos estudios no concuerdan sobre su eficacia clínica, y este método de diagnóstico sigue siendo muy debatido en la literatura médica científica y clínica. Los autores concluyen en seguir innovando en métodos presuntivos eficientes y eficaces desde este punto de vista que ayuden al clínico en el diagnóstico, y asegurar su sensibilidad y especificidad al obtener resultados significativos en los estudios *in vitro*.

Tomo et al. (2019), realizaron una revisión de los retos dentro de la prevención y diagnóstico precoz del carcinoma oral de células escamosas y de lesiones orales potencialmente malignas a través del uso de la visualización por fluorescencia. Identificaron que dicho método se ha perfeccionado como auxiliar para detectar precozmente alteraciones en la mucosa oral sugestivas de malignidad o premalignidad. Sin embargo, quizás debido a alguna interpretación errónea respecto a la finalidad clínica de este método, su aplicabilidad puede haber sido subestimada.

Baush et al. (2009), indagaron la detección de la malignidad mediante nuevos biomarcadores de Plectina-1 (Plec-1), proteína de unión de alto peso molecular. Para ello, se analizó la expresión de Plec-1 en células benignas, así como malignas y detectaron la sensibilidad y especificidad a través de cultivos celulares. Los resultados mostraron una afinidad significativa de Plec-1 para distinguir células malignas de



benignas del 83% y su sensibilidad del 84%. Estos datos apoyan a Plec-1 como un excelente biomarcador para la detección temprana del carcinoma y la necesidad de corroborar la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores en estudios *in vitro*.

Jalali et al. (2021), investigaron el poder de *P. harmala*, planta autóctona en las regiones del Mediterráneo e India, en el tratamiento del cáncer, a través de una revisión sistemática. Localizaron 42 artículos relacionados con el tratamiento del cáncer y 22 artículos sobre componentes bioactivos de alcaloides. Dentro de sus resultados encontraron una citotoxicidad del 5% en estudios *in vitro*, y en sus hallazgos, pudieron constatar que los ensayos de citotoxicidad predicen las respuestas clínicas con una alta sensibilidad y especificidad. Esto quiere decir, evaluar el poder máximo curativo previo al empleo *in vivo* de cualquier sustancia.

Hema et al. (2019), realizaron una revisión sistemática donde compararon los biomarcadores orales en saliva. Se analizaron nueve artículos en los que se compararon 308 individuos sanos con 340 pacientes con carcinoma oral de células escamosas. Los resultados mostraron que los biomarcadores salivales pueden utilizarse como herramienta de diagnóstico altamente sensibles y específicos, para la detección temprana de lesiones orales potencialmente malignas. Por otro lado, se argumenta el poder de rendimiento de estos biomarcadores en un 20% para establecer un uso no citotóxico.

En síntesis, los estudios revelan que las pruebas de detección de lesiones orales potencialmente malignas apoyadas con fluorescencia cumplen los requisitos que demandan las pruebas de detección rápidas establecidos por The Oral Cancer Foundation, y pueden ser realizadas mediante enjuague y raspado oral, pudiendo ser confirmadas con un estándar de oro como lo son las pruebas moleculares por PCR. Las bondades que presentan este tipo de procedimientos son mayor eficacia, confiabilidad, economía y aceptación en la comunidad científica y usuarios. Además, la detección enfermedades y lesiones orales relacionadas mediante fluorescencia resultan buen predictor inicial para la detección de las patologías como cáncer oral sin suplir los

métodos de detección convencionales, constatando que este tipo de método de detección revela lesiones orales sin aparente presencia, sin embargo, no suple los métodos tradicionales y requiere una confirmación posterior.

Por otro lado, se hace hincapié en el empleo de biomarcadores en base a extractos naturales, que sean probados en estudios *in vitro* previos al uso *in vivo*, donde se constate su biocompatibilidad a través de cultivos celulares permitiendo establecer su rendimiento en un 20% mínimo, y citotoxicidad en un 5% máximo, y su sensibilidad y especificidad en un 70% mínimo corroborada en cultivos celulares con diferencias significativas entre células malignas y no malignas.

### ***Tecnología Médica***

MacGregor et al. (2021), emplearon una luz UV de onda corta como alternativa a la cistoscopia. Para ello, realizaron una revisión de literatura donde se determinó los elementos a emplear. Los procesos para su realización fueron realizados mediante consenso y fue probado con líneas celulares modelo. Como resultados obtuvieron que la herramienta fue no invasiva, logrando tasas de captura altamente específicas de células cancerosas de vejiga basadas en su expresión de moléculas de adhesión de células epiteliales (> 90%) y detección por los niveles de intensidad de fluorescencia. Luego, realizaron un estudio piloto para probar la herramienta con pacientes de cáncer diagnosticados histopatológicamente ( $n = 10$ ) y sin cáncer ( $n = 25$ ), demostrando su discriminación selectiva. Como conclusiones declaran el haber empleado una luz UV como diagnóstico no invasivo para la vigilancia posterior al tratamiento en pacientes con cáncer de vejiga y la detección de cáncer en pacientes con sospecha de cáncer de vejiga.

Venkataramana y Shankapal (2020), desarrollaron y validaron en India una mano biónica para la detección temprana del cáncer y trastornos orales potencialmente malignos a través de un aditamento adaptable a cualquier teléfono móvil, aprovechando las propiedades de la autofluorescencia tisular para la detección temprana de estas lesiones con luz UV. Se validó a través de PCR, donde se tomaron muestras de un total

de 80 lesiones incluyendo las normales. Dos tercios de los pacientes incluidos eran hombres y la edad media global fue de 60 años. De las 80 muestras, 35 muestras mostraron pérdida de autofluorescencia, mientras que 45 las muestras mostraron retención de autofluorescencia. De las 45 muestras que mostraron autofluorescencia verde pálido, 40 eran de muestras de tejido normal y 5 de tejido las muestras procedían de pacientes con fibrosis submucosa oral. Utilizando la histología como estándar de oro, la herramienta alcanzó una sensibilidad del 100% y especificidad del 100% en la detección de leucoplasia oral. En el caso de controles normales, se encontró que tanto la sensibilidad como la especificidad eran del 100%. Se constata el empleo de fluorescencia y luz UV en la identificación de lesiones con potencial maligno con alta sensibilidad y especificidad.

Tipirneni et al. (2018), analizaron imágenes de fluorescencia para la detección de células cancerosas en el campo de la oncología, por medio de una luz UV de onda corta (400 a 700 nm) que apoyara en la detección y la vigilancia del cáncer. Como conclusiones declaran que esta tecnología tiene la promesa de resaltar las células que no se detectan fácilmente mediante imágenes convencionales o examen físico, lo que permite la detección de enfermedades en una etapa más temprana de desarrollo. Además, existe una necesidad persistente de modalidades de imágenes innovadoras y rentables para mejorar las disparidades en la atención médica y la carga global del cáncer en todo el mundo.

Wang et al. (2018), analizaron el papel de las ondas fluorescentes UV para la visualización de células vivas y los retos existentes a través de una revisión de literatura. Examinaron las tendencias junto con las propiedades químicas y espectroscópicas requeridas de las ondas fluorescentes. Como resultados, encontraron que el empleo de la fluorescencia en la visualización celular ha abierto la posibilidad de estudiar procesos dinámicos con una resolución espacial y temporal sin precedentes. Para lo anterior, resaltan la necesidad de contar con equipo tecnológico para ello como lo son

microscopios de fluorescencia capaces de visualizar longitudes de onda entre los 400 a 700 nm, tener alta fidelidad y calidad en imágenes.

Tatehara et al. (2020), realizaron una revisión de literatura acerca de los métodos de diagnóstico empleando luz UV. Dentro de sus datos, se encuentra el dato de un estudio de detección de lesiones orales potencialmente malignas a través del diagnóstico fotodinámico con ácido 5-aminolevulínico (ALA-PDD), fotosensibilizador en la detección con fluorescencia. Dentro de sus resultados, encontraron la mucosa bucal como el sitio más prevalente en la presencia de dichas lesiones. Constataron la necesidad de realizar más estudios para comprobar dicha información en más grupos poblacionales y comprobar el poder discriminatorio de las herramientas apoyadas con fluorescencia.

En síntesis, la tecnología médica guía el empleo de la luz UV para la detección de padecimientos de cualquier índole, estableciendo pautas, consideraciones y recomendaciones generales para su empleo. Como principal encomienda se declara el poder utilizar luz UV de onda corta, comprendida entre los 400 a los 700 nm, debido a su relación con la detección de microorganismos sensibles a fluoróforos presentes en ellos. Respecto a las presentaciones de luz UV, se aconseja las de tipo portátil debido a su tamaño y practicidad de uso, consideradas buenos aliados como instrumentos en la detección del VPH oral y lesiones orales relacionadas. Por otro lado, se corrobora la necesidad de realizar ensayos clínicos comparados con estándar de oro en ensayos *in vitro*. Es vital la utilización de microscopios de fluorescencia capaces de medir la intensidad de fluorescencia en cultivos celulares, y en ensayos *in vivo*, se señala la mucosa bucal como el sitio más frecuente de presencia de lesiones orales detectadas con estos aditamentos.

### ***Declaración STARD***

Giguère et al. (2020), desarrollaron en Canadá la Digit Triplet Test (DTT), una prueba de detección de voz en ruido que utiliza combinaciones de tres dígitos como material de voz, también llamados tripletes de dígitos la cual se desarrolló en inglés y

francés, los idiomas oficiales de Canadá, para ello emplearon las fases propuestas para la elaboración de instrumentos diagnósticos. En la Fase I se abordó el desarrollo de la prueba de investigación sobre la homogeneización de la identificación de números en las fichas y posiciones de los jóvenes dentro de los trillizos adultos con audición normal ( $n = 48$ ). En la Fase II, se recopilaron datos normativos sobre jóvenes adultos con audición normal ( $n = 64$ ). Finalmente, se encontró que las características estadísticas son consistentes durante todo el proceso. La versión de prueba es comparable a las pruebas de tripletes digitales en otros idiomas.

Negin et al. (2020), realizaron un estudio en Irán donde desarrollaron la versión persa de la prueba de Síntesis Fonémica (TSF), para evaluar sus propiedades psicométricas y generar datos normativos. Dicho estudio consistió en tres fases; Fase I el desarrollo del TSF, Fase II determinar la validez y confiabilidad de la prueba, y Fase III generar datos normativos. Para lo anterior se desarrollaron pruebas, incluida la optimización de materiales, determinación de contenido y validez facial y evaluación de propiedades psicométricas. Participaron 425 sujetos donde diez expertos participaron en la etapa de evaluación de la validez de contenido. La validez aparente se determinó tomando las opiniones de 17 sujetos, incluidos niños diagnosticados con APD, niños normales y expertos. Todos los participantes fueron reexaminados después de cuatro semanas para evaluar la fiabilidad test-retest. Como resultados se reveló el fuerte contenido y la validez aparente de la prueba, sin diferencias significativas se observaron entre los géneros. Se observaron diferencias significativas en las puntuaciones cuantitativas y cualitativas entre los grupos de edad. El coeficiente de correlación de Spearman mostró que las puntuaciones del prueba y re prueba se correlacionaron fuerte y positivamente ( $r = .9$ ).

Chiu et al. (2020), desarrollaron un ensayo Fase I *in vitro* de cribado de alto rendimiento para la actividad anti-SARS-CoV-2, dónde evaluaron células epiteliales de riñón de mono VeroE6 y su respuesta frente a ciertos medicamentos. Se identificaron

ocho fármacos (nelfinavir, RG-12915, itraconazol, cloroquina, hidroxicloroquina, sematilida, remdesivir y doxorubicina) como inhibidores de la actividad anti-SARS-CoV-2 *in vitro* en las líneas celulares, sin embargo, los autores concluyen que estos datos no son definitivos y deben seguir a una Fase II donde se evalúe el potencial de los medicamentos analizados en estudios *in vivo*.

Kaur et al. (2018), realizaron una revisión sistemática de la literatura evaluando el potencial de los biomarcadores naturales frente a lesiones orales potencialmente malignas y cáncer oral. Para lo anterior, analizaron 48 artículos de las bases de datos de Medline, PubMed y EMBASE, y como principales resultados obtuvieron que la combinación de biomarcadores naturales podría utilizarse como herramienta de cribado para mejorar la detección precoz y la precisión diagnóstica. También, resaltan imprescindible el probarlos siguiendo una metodología estricta como lo es STARD, y comenzar con una Fase I de pruebas *in vitro*, para su posterior implementación *in vivo*. Aunado a lo anterior, destacan la gran importancia que presentan para que los clínicos e investigadores mitiguen los desafíos en la detección de lesiones orales potencialmente malignas y cáncer oral.

Saksø et al. (2020), realizaron un ensayo clínico Fase I, en mujeres voluntarias iraníes sanas, para evaluar la seguridad, tolerabilidad y la inmunogenicidad de la vacuna anti VPH-NZ8123-HPV16-optiE7. En el estudio se incluyeron 55 sujetos divididos en seis cohortes en función de las dosis. Como principales resultados resaltan que el estudio anima a realizar más ensayos de Fase II con la vacuna de dosis de  $5 \times 10^9$  UFC/mL, y como hallazgos encontraron que aquellas mujeres expuestas a factores de riesgo como fumar tabaco, beber alcohol y presencia de ciertas comorbilidades pudieran estar más expuestas a presentar VPH.

En síntesis, la investigación de futuras pruebas diagnósticas debe seguir un protocolo estricto para asegurar su precisión, empleando métodos que permitan la determinación del poder curativo de dichas pruebas. STARD es una metodología que

resulta de gran utilidad para guiar el desarrollo, implementación y seguimiento de invenciones médicas, y pueden aplicarse a cualquier campo de las ciencias de la salud. También sirve como régimen en la comprobación de utilidad que tienen las nuevas invenciones en materia de detección de enfermedades, sin embargo, esta se enfoca solamente a métodos ya elaborados previamente, por lo cual, si no ha sido elaborado, debe ser previamente desarrollado para ser posteriormente probado empleando esta metodología.

Por otro lado, se corrobora que STARD es una metodología flexible, lo cual implica poder modificar y adaptar sus fases de acuerdo con la conveniencia de la situación. Sobresale el análisis de factores de riesgo que pueden obtenerse de la Fase I de STARD, que en el caso de VPH oral comprenden el consumo de tabaco y alcohol, presencia de comorbilidades y lesiones orales preexistentes.

### **Objetivo General**

Determinar la capacidad del biomarcador natural fluorescente en el tamizaje de lesiones orales potencialmente malignas.

### ***Objetivos Específicos***

1. Determinar la biocompatibilidad del biomarcador natural fluorescente en un modelo *in vitro* de células sanas.
2. Evaluar la sensibilidad y especificidad del biomarcador natural fluorescente validando los datos en un modelo *in vitro* de células malignas.
3. Obtener criterios objetivos de discriminación por el biomarcador natural fluorescente en cavidad oral de participantes en población abierta.
4. Analizar las características que determinan padecer lesiones orales potencialmente malignas de participantes en población abierta.

### **Hipótesis**

H<sub>1</sub>. El biomarcador natural fluorescente muestra un rendimiento mínimo del 20% del extracto de metanol de *Cinchona officinalis*.

H<sub>2</sub>. El biomarcador natural fluorescente presenta diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia en células malignas y no malignas en las pruebas in vitro realizadas.

H<sub>3</sub>. Fumar tabaco, beber alcohol, presencia de comorbilidades y contar con antecedentes heredofamiliares de cáncer son factores de riesgo significativos para la presencia de lesiones orales potencialmente malignas a través del empleo del biomarcador natural fluorescente y luz UV.

H<sub>4</sub>. El sitio de fluorescencia es una característica que determina padecer VPH oral.



## Capítulo II

### Metodología

En este apartado se describe la metodología adaptando el modelo de Arquitectura para la Investigación de Pruebas Diagnósticas de Gludd y Gludd (2015). Se presentan la Fase Preliminar, la Fase I y II en las cuales se incluye el diseño del estudio, población, muestra y muestreo, criterios de inclusión, exclusión y eliminación, instrumentos de medición, procedimiento de recolección de datos, consideraciones éticas, de bioseguridad y el plan de análisis.

#### **Fase Preliminar: Diseño, Elaboración y Viabilidad del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV**

En esta fase se describe la metodología empleada para la determinación de los elementos y descripción de los pasos para la realización del biomarcador natural fluorescente y luz UV. También se describe el proceso de análisis de viabilidad a través de pruebas *in vitro*.

##### ***Diseño del Estudio***

Observacional, ya que se compararon los efectos del biomarcador natural fluorescente y luz UV atribuidos al cultivo celular (Gray et al., 2016).

##### ***Población, Muestra y Muestreo***

La unidad de análisis estuvo conformada por los ingredientes para el biomarcador natural fluorescente, los elementos la luz UV, células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™), células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) y fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™).

##### ***Criterios de Inclusión***

Fueron ingredientes de origen natural, con nula toxicidad, y de fácil acceso. Los elementos de la luz UV fueron de bajo voltaje y cables de doble cubierta. Las células fueron de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™), células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) y fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™).

### ***Criterios de Eliminación***

Ingredientes fermentados y células que hayan muerto en el proceso.

### ***Instrumentos de Medición***

Se utilizó el estándar de oro de la luz UV y el biomarcador natural fluorescente para realizar una comparación ciega y controlada, y el cultivo celular para la comprobación preliminar de la selectividad por células de cáncer.

### ***Procedimiento de Recolección de Datos***

**Diseño y Elaboración.** En este apartado se describen los pasos para determinar los componentes y conformar el biomarcador natural fluorescente y luz UV.

**Biomarcador Natural Fluorescente.** Para determinar los componentes que integraron el biomarcador, se realizó una revisión sistemática, donde se tuvo como objetivo comparar los diferentes elementos con propiedades fluorescentes que absorben energía en forma de radiación electromagnética de onda corta. Los resultados indicaron que las sustancias ideales para realizar pruebas en seres humanos deben provenir de productos orgánicos, inocuos, de fácil acceso en la región donde se emplee, económico, contar con acceso legal y baja o nula toxicidad.

Para la realización del biomarcador propuesto se concretaron reuniones entre el equipo multidisciplinario, para discutir lo encontrado en la revisión sistemática y definir los elementos fluorescentes a emplear. Posteriormente, se realizaron pruebas *in vitro* donde se determinaron cuáles sustancias y qué cantidad llevará el biomarcador natural fluorescente. Cabe señalar que a medida que se realizó el biomarcador natural fluorescente, se realizaron pruebas de ensayo y error probando con diferentes proporciones de los elementos, donde se comparó la fluorescencia del biomarcador natural fluorescente con el estándar de oro (Schweppes®) en el cuarto oscuro de laboratorio. Para cumplir con lo anterior, se siguieron los siguientes pasos:

1. Se trituraron las cortezas de la raíz de *Cinchona officinalis* de forma manual para tener un menor tamaño, luego con mortero y finalmente en licuadora hasta obtener un polvo fino.
2. Posteriormente, con apoyo de una báscula de laboratorio y una espátula, se pesaron la cantidad de gramos a emplear del polvo de la raíz electa. Se procedió a hervir agua bidestilada en un vaso de precipitado grande con ayuda de un agitador magnético y se agregó el polvo.
3. Se dejó reposar la solución obtenida por un espacio de tiempo determinado. Una vez que la solución se encontró a temperatura ambiente se realizó una doble filtración con apoyo de un cernidor y posteriormente con papel filtro de 22  $\mu$ .
4. Una vez obtenido el concentrado, se procedió a la formulación final agregando elementos adicionales:
  - 0.001 – 1.000 gr. de sacarosa
  - 0.001 – 1.000 gr. de ácido cítrico
  - 0.001 – 1.000 mL de extracto de *citrus × aurantifolia*
  - 0.001 – 1.500 mL de extracto de quina
  - 0.001 – 100.000 mL de agua purificada
  - 0.001 – 300.000 mL de agua mineral
5. Se procedió a mezclar todos los anteriores ingredientes en un vaso de precipitado grande nuevo.
6. Finalmente, se agregó 0.001 – 20.000 mL de  $C_2H_4O_2$  a la anterior mezcla.
7. Una vez obtenida la misma fluorescencia entre biomarcador natural fluorescente propuesto y el estándar de oro (formulación fluorescente comercial Schweppes®) ante la presencia de luz UV, y ser comparada fotográficamente se procedió a aplicar en un cultivo de células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™) y células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) para observar su reacción con ayuda de luz UV, el

cual fue comparado antes y después de agregar el biomarcador natural fluorescente y luz UV.

**Luz UV.** Para determinar la fuente de luz UV ideal, se realizó una revisión de literatura donde se compararon las diferentes fuentes de radiación electromagnética de onda corta, sus aplicaciones, usos, contraindicaciones y rango nanométrico a cubrir; también se consideraron elementos como costo, accesibilidad, e inocuidad. Una segunda revisión de literatura fue realizada para determinar los elementos y características de la luz UV en cavidad oral; ventajas y cualidades (Figura 3).

Una vez obtenida la información, los resultados obtenidos fueron vaciados en una tabla para facilitar su comparación, donde se expusieron las propiedades de cada una de las fuentes de emisión del espectro electromagnético, y los elementos y características de la luz UV. Lo anterior se realizó mediante consenso entre el equipo de expertos, permitiendo elegir la fuente de luz, longitud de onda, frecuencia y energía ideales correspondientes a la misma.

Se determinó que el tipo de cable debe ser de 5 mm de grosor, color UV de 395-400 nm, y un voltaje de 9 a 12V. Posteriormente, se procedió a la elaboración de la luz UV:

- Se descortezaron los últimos 1-5 mms. del cable “a” y “b” para exponer su punta al exterior.
- El cable se sujetó a un filamento firme de 1-50 mms. de largo para obtener firmeza, sujeción y fácil manejo.
- El cable y el filamento fueron envueltos con apoyo del elemento “c” dejando las puntas expuestas al exterior.
- Las puntas de ambos cables “a” y “b”, fueron conectadas a una fuente de emisión de energía de 1- 20V y a un tablero tipo “d” con interruptor.
- La fuente de energía junto con el tablero fue colocada dentro de otra caja pequeña de material seleccionado para mayor estética.

- Los cables con el filamento firme fueron envueltos en el material “d” seleccionado dejando 1-5 mms. libres de la punta emisora de luz.
- Posteriormente el cable con el filamento envuelto en el material selecto fue nuevamente cubierto por un último material “f” seleccionado para su empleo.

**Evaluación de la Viabilidad.** En este apartado se describen los pasos para determinar la posibilidad de emplear el biomarcador natural fluorescente y luz UV en las futuras pruebas de carácter *in vitro* e *in vivo*.

**Comparación con el Estándar de Oro.** Para evaluar la probabilidad que existe de poder llevar a cabo un proyecto con éxito empleando un biomarcador natural fluorescente y luz UV, primeramente se evaluó la viabilidad a través de pruebas *in vitro* donde se compararon con el estándar de oro. Esto significa, elegir una luz UV comercial de libre acceso en tiendas de conveniencia con características similares a la luz UV aquí propuesta. El estándar de oro elegido en el caso de la luz UV fue lámpara de 12 V (lámpara UV marca FULL, modelo XML-T6+COB LED, material aluminio, especificaciones switch botón de encendido en la base ON/OFF, batería recargable por micro USB, tamaño 9.3cm\*4,2cm\*2.4cm, peso 57 grs.), se corroboró que ambos emitieran una fuente de luz igual o parecida a simple vista.

En el caso del biomarcador natural fluorescente, se eligió Schweppes® (agua tónica, presentación botella de vidrio de 296 ml. marca Peñafiel®) como estándar de oro, ya que es una bebida apta para consumo humano con las mismas propiedades que el biomarcador natural fluorescente aquí propuesto. Se corroboró que ambas sustancias tuvieran la misma intensidad de fluorescencia al ser expuestas ante la luz UV al ser colocadas en dos frascos independientes. Fueron comparados fotográficamente y se logró que tanto biomarcador natural fluorescente como estándar de oro tuvieran el mismo grado de fluorescencia.

**Cultivo Celular Preliminar.** Posterior a la comparación del biomarcador natural fluorescente y luz UV con el estándar de oro, se procedió a una evaluación de la

selectividad con células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™), células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) y de fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™) como control a través de un cultivo celular preliminar a baja escala. Esto significa comprobar si verdaderamente el biomarcador natural fluorescente y luz UV tienen afinidad por células cancerígenas. Las áreas por emplear dentro del laboratorio fueron área de cultivo celular, esterilización y de microscopía óptica. Los pasos fueron los siguientes:

1. Se cultivaron células de fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™) como control sano y células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™) y células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) solas y en co cultivo durante 24 hrs a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sup>2</sup> y colocadas en placas de 6 pozos.
2. Pasado el tiempo pactado se retiró el medio de cultivo.
3. Se agregó 1 mL de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> al 99.99%, presentación 500 ml., marca Honeywell de CTR Scientific, clave producto 7499. Se retiró después de un lavado.
4. Se agregó 1 mL del biomarcador natural fluorescente y fue llevado al microscopio.
5. El cultivo celular fue evaluado mediante microscopía óptica y luz UV a 4, 10 y 40X, donde se capturaron fotografías con equipo digital Carl Zeiss® y fueron comparadas para su análisis.

### ***Consideraciones de Bioseguridad***

Este estudio se apegó al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Secretaría de Salud, 1987; enmienda 2014) que establece los lineamientos y principios generales a los que se debe someter la investigación científica. De acuerdo con el Artículo 3, Fracción IV, la presente investigación se encontró en aquellas que comprenden el desarrollo de acciones que contribuyan al desarrollo de insumos para la salud ya que se planteó desarrollar un biomarcador natural fluorescente y utilizar luz UV para tamizaje de lesiones orales potencialmente malignas.

Con atención al Título Tercero esta investigación fue considerada como Investigación de Nuevos Recursos Profilácticos, Diagnósticos, Terapéuticos y de Rehabilitación, ya que se planteó desarrollar un biomarcador natural fluorescente y utilizar luz UV para tamizaje de lesiones orales potencialmente malignas. Se solicitó autorización del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Artículo 62), y se trabajó en el laboratorio Unidad de Odontología Integral y Especialidades (UOIE) del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), y el Laboratorio de Inmunología y Virología, Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, los cuales cuentan con las debidas acreditaciones para su funcionamiento (Artículo 75, Fracción I).

Adicionalmente, los anteriores laboratorios contaron con un protocolo de procedimientos a disposición de los usuarios, y en ambos lugares el personal estableció los procedimientos de manejo, transporte y control de las muestras y de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI), se estableció un programa de vigilancia continua y se contó con bibliografía actualizada referente a temas de contingencia (Artículo 75, Fracción II a VII). De acuerdo al Artículo 76, estos laboratorios fueron considerados como Laboratorios básicos de Microbiología, puesto que se realizaron cultivos y reactivos controlados.

Por otro lado, el trabajo realizado en laboratorio fue cultivo celular, preparación de reactivos y análisis (Artículo 77, Fracción I), se utilizaron barreras de protección personal como bata clínica, guantes desechables, cubrebocas, lentes de protección y gorro (Artículo 77, Fracción II), el personal del laboratorio se encargó del mantenimiento de los equipos a emplear (Artículo 77, Fracción III), se siguió el protocolo establecido en cada laboratorio en caso de una eventualidad (Artículo 77, Fracción IV), y los materiales biológicos a emplear fueron transportados únicamente por la empresa certificada (Artículo 77, Fracción VI). El desecho de los reactivos biológicos

fue siguiendo el protocolo establecido y depositado en el contenedor correspondiente de RPBI (Artículo 77, Fracción VII), y la descontaminación estuvo a cargo del personal de los laboratorios (Artículo 77, Fracción VIII).

Se utilizó una campana de flujo laminar clase IIA para la manipulación de las células de cáncer cervical HeLa (ATTC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>), células de cáncer de colon HT-29 (ATCC<sup>®</sup> HTB-38<sup>™</sup>) y de fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC<sup>®</sup> PCS-201-018<sup>™</sup>), ya que en este tipo de cabinas la superficie de trabajo se encuentra bañada por aire limpio atravesado un filtro HEPA (Artículo 77, Fracción IX).

El investigador principal junto con su comité de tesis decidió las locaciones idóneas para la realización de sus experimentos (Artículo 78), y de acuerdo con el grado de riesgo de infección, la presente investigación se consideró como Grupo de Riesgo II, ya que las células cancerígenas a emplear presentaron un riesgo moderado para el individuo y limitado para la comunidad al trabajar con todas las medidas de bioseguridad, además los procedimientos fueron realizados en el área designada de cultivo celular, la cual contó con campana de flujo laminar, incubadora de CO<sup>2</sup>, refrigerador, e insumos necesarios para realizar el cultivo celular (Artículo 79).

De acuerdo a la American Type Culture Collection (ATCC<sup>®</sup>), los experimentos fueron llevados a cabo en un laboratorio pertinente para el presente estudio nivel BSL-2, ya que los laboratorios antes mencionados cuentan con la capacidad para trabajar con organismos infecciosos y medidas mejoradas de seguridad como lo son la capacitación frente a cortes, roturas, ingestas accidentales y exposición de membranas o mucosas. Para prevenir futuros incidentes, el investigador principal llevó una capacitación de bioseguridad por parte del CIDICS, y cuando se llevaron a cabo los experimentos, se procuró trabajar con el menor número posible de asistentes para mitigar el riesgo de contagio por COVID-19, esto se logró entregando una calendarización de actividades al encargado del laboratorio. El investigador principal llevó consigo alcohol al 80% de



pureza y Lysol® para desinfectar la campana de flujo laminar, incubadora de CO<sup>2</sup> y demás superficies a emplear (Artículo 80).

Respecto al Artículo 83, el investigador principal tuvo la capacitación profesional necesaria para determinar los riesgos existentes (Fracción I), determinar los procedimientos a realizar (Fracción II), informar a la comisión de Bioseguridad cualquier ocurrencia de enfermedad (Fracción V), y reportar las fallas y dificultades que hayan sucedido (Fracción V). De conformidad con el Artículo 84, la comisión de Bioética de la Facultad de Enfermería de la UANL pudo realizar visitas aleatorias para supervisar la correcta ejecución de los procedimientos.

#### ***Plan de Análisis de Datos***

Comparación fotográfica de la luz UV con el estándar de oro, comparación fotográfica del biomarcador natural fluorescente con el estándar de oro, y comparación fotográfica de las células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™), células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™) y células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) con y sin el biomarcador natural fluorescente y luz UV.

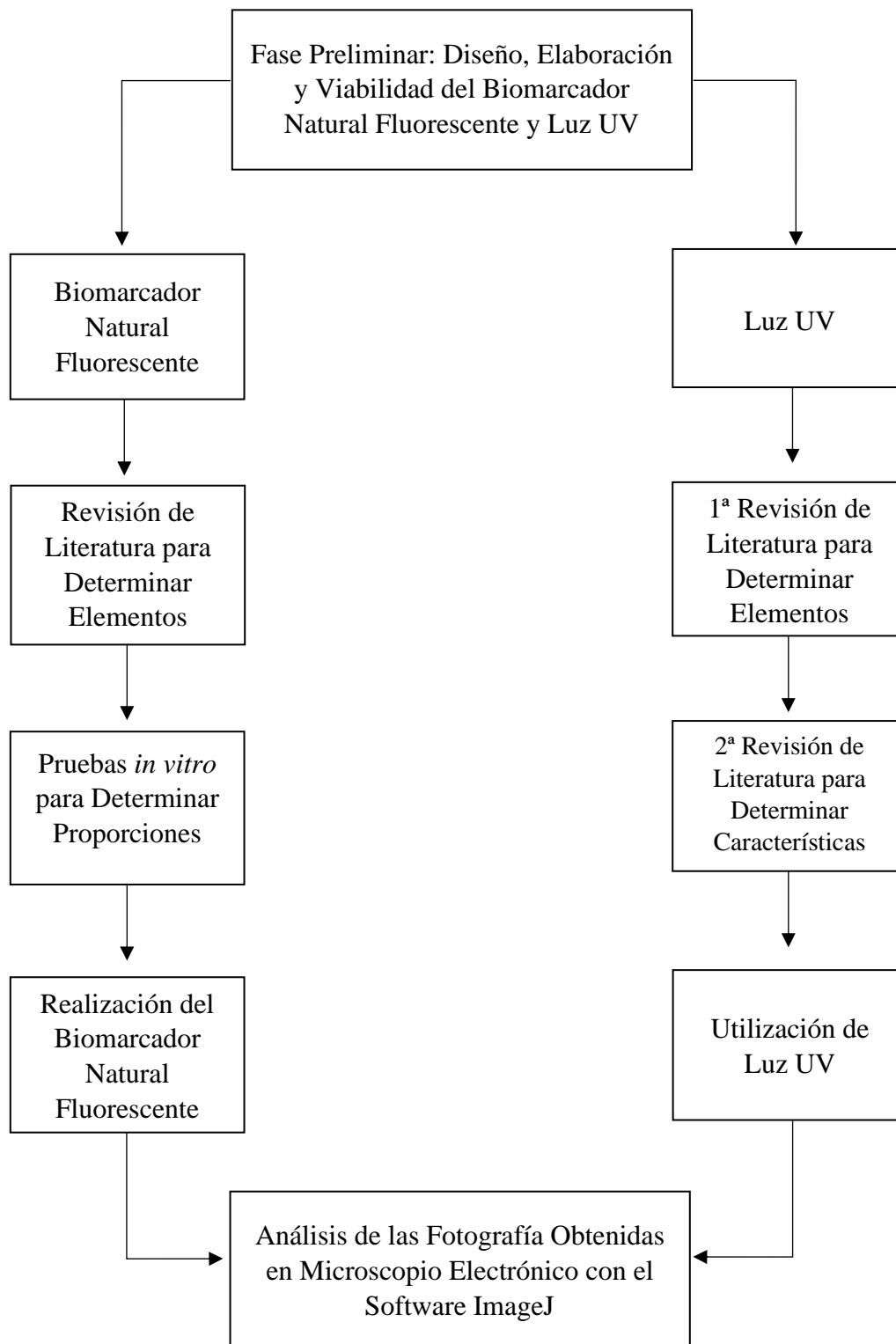


Figura 3. Diagrama de Flujo de la Fase Preliminar: Diseño, Elaboración y Viabilidad del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV

## **Fase I: Experimentación del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV (*in vitro*)**

En esta fase se describe la metodología diseñada para la comprobación de utilidad de la luz UV y comprobar la sensibilidad y especificidad del biomarcador natural fluorescente por medio de un cultivo celular.

### ***Diseño del Estudio***

Experimento observacional *in vitro* ya que no existe intervención y solo se limitará a medir las variables que intervienen en el estudio (Gray et al., 2016).

### ***Población, Muestra y Muestreo***

HeLa (ATTC® CCL-2™): células de cáncer cervical, HT-29 (ATCC® HTB-38™): células de cáncer de colon y HGF (ATTC® PCS-201-018™): fibroblastos gingivales humanos, las cuales fueron adquiridas por una distribuidora autorizada en el ramo. El tamaño de muestra aproximado fue de 4,105,000 células por ml. de cada una, y fue realizado mediante el conteo de células con cámara de Neubauer bajo la siguiente fórmula:

$$\left( \frac{\text{Total de células}}{4} \right) (\text{Factor de dilución}) (10,000) = \text{Número de células por ml.}$$

$$(205.25) (2) (10,000) = 4,105,000 \text{ células por ml.}$$

Se empleó un muestreo por conveniencia, ya que el investigador principal seleccionó las células a emplear (Etikan et al., 2016).

### ***Criterios de Inclusión***

Células que permanezcan vivas después del proceso de incubación.

### ***Criterios de Exclusión***

Células apoptóticas, o que hayan resultado dañadas en el proceso.

### ***Criterios de Eliminación***

Células contaminadas.

### ***Instrumentos de Medición***

Se empleó la evaluación de la actividad citotóxica para determinar la concentración del biomarcador natural fluorescente que no presentó un efecto citotóxico en células sanas y cuál concentración no citotóxica es la que mantiene la selectividad hacia células potencialmente malignas. También se empleó el cultivo celular para la comprobación de la selectividad por células de cáncer.

### ***Procedimientos de Recolección de Datos***

**Biomarcador Natural Fluorescente.** En este apartado se describen los pasos para establecer la biocompatibilidad a través de pruebas de citotoxicidad y rendimiento diagnóstico, y sensibilidad y especificidad mediante la determinación de la intensidad de fluorescencia en cultivos celulares.

**Evaluación de la Actividad Citotóxica.** Las células HGF (ATTC® PCS-201-018™) fibroblastos gingivales humano, células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) y células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™), se incubaron hasta obtener la concentración de  $5 \times 10^4$  células/mL y se colocaron 190  $\mu$ L en placas de 96 pozos, posteriormente se colocaron los tratamientos. Las placas se incubaron a 37°C por 48 horas a 5.0% de CO<sup>2</sup> y 55% de humedad relativa. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 15  $\mu$ L de MTT a los pozos (concentración final 0.5 mg/mL) y se incubaron 4 horas. Al término de la incubación se decantó la solución, se adicionó 100  $\mu$ L de DMSO a cada pozo y se midió la densidad óptica a 570 nm en un lector de microplacas. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado con la siguiente fórmula (Quintanilla et al., 2016):

$$[\% \text{ citotoxicidad} = 100 - [(A570 \text{ células tratadas}/A570 \text{ células no tratadas}) (100)]$$

**Cultivo Celular.** Se realizó una evaluación in vitro de la selectividad por las células HGF (ATTC® PCS-201-018™) fibroblastos gingivales humanos, células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) y células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™) cáncer cervical, a través del biomarcador natural fluorescente y la dosis

elegida en la evaluación de la actividad citotóxica. Este procedimiento constó de los siguientes pasos:

- Se descubrieron los últimos 1-5 mms. del cable “a” y “b” para exponer sus componentes internos al exterior.
- Posteriormente, la mezcla resultante fue esterilizada por filtración con filtros de .22  $\mu\text{m}$  y almacenada a 4°C hasta su uso.
- Se prepararon las células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™, células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) y fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™) en 3 placas para cultivo celular de 96 pozos. Lo anterior, correspondiendo al máximo grado de concentración no tóxico de la fórmula propuesta y las repeticiones a realizar. Las células se cultivaron solas y en co cultivo en un medio de RPMI con SFB al 10%, y atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante una fracción de tiempo pactado.
- Transcurrido el tiempo pactado, las células fueron retiradas de la incubadora, rotuladas, y extraído el medio de cultivo “a” excedente. Esta parte fue repetida varias ocasiones.
- Se aplicó el biomarcador natural fluorescente en solución de Hank’s en la concentración no citotóxica elegida.
- Se agregó 1 mL de ácido acético comercial y se retiró después de un lavado.
- Se analizaron las cajas de cultivo en el cuarto oscuro de laboratorio bajo el microscopio electrónico y luz UV.
- Se tomaron una fotografía a 4, 10 y 40X para su posterior análisis estadístico.

**Luz UV.** Para la comprobación de la luz UV, se llevaron a cabo pruebas in vitro con el estándar de oro y adicionalmente se seleccionarán luces UV comerciales emisores de luz UV en diferentes presentaciones que contaron con características similares a la luz UV (Figura 4). Las presentaciones empleadas fueron las siguientes:

- Luz UV presentación lámpara de bolsillo de 5-10 LED.

- Luz UV presentación lámpara de bolsillo de 10-15 LED.
- Luz UV precableado presentación de 1-10 mm. con voltaje de 5-10V sencilla.
- Luz UV precableado presentación de 11-20 mm. con voltaje de 10-15V doble.
- Luz UV precableado presentación de 1-10 mm. con voltaje de 5-10V sencilla.
- Luz UV precableado presentación de 11-20 mm. con voltaje de 10-15V doble.

Posteriormente, se llevaron a cabo las pruebas *in vitro*, que correspondieron a la experimentación de las diferentes presentaciones de luz UV frente al biomarcador natural fluorescente, lo anterior se realizó en el cuarto oscuro del laboratorio. Se logró que la luz UV, estándar de oro y dispositivos seleccionados mostraran un comportamiento uniforme. La información obtenida se documentó para su posterior discusión con el equipo de expertos.

### ***Consideraciones de Bioseguridad***

Las consideraciones de bioseguridad de la Fase I fueron las mismas que la Fase Preliminar.

### ***Plan de Análisis de Datos***

Para dar respuesta al objetivo uno, determinar la biocompatibilidad del biomarcador natural fluorescente a partir de un cultivo de células sanas, el biomarcador natural fluorescente se colocó en un cultivo de células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™) a diferentes concentraciones, comparando el efecto que tengan estas en la viabilidad durante 24 horas de incubación comparado con células que no tengan este tratamiento. Obtenidos los resultados de las células tratadas y no tratadas los porcentajes de viabilidad fueron determinados dividiendo los promedios de los datos obtenidos de cada concentración entre los promedios de los datos de las células no tratadas multiplicado por 100, seleccionando la concentración con el porcentaje de viabilidad mayor o igual al 99%.

Para responder al objetivo dos en el cual se evalúa la sensibilidad y especificidad del biomarcador natural fluorescente validando los datos en un modelo *in vitro* de

células malignas, se procedió a tratar células cancerígenas con la concentración no tóxica de la solución fluorescente, posteriormente se cuantificó la emisión de fluorescencia con el software ImageJ; programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado por Java y desarrollado en el National Institute of Health, el cual permitió realizar comparaciones de múltiples datos de sistema de imagen. Este programa generó datos numéricos que permitieron realizar un análisis de los datos generando un gráfico de tipo ROC, el cual se utilizó para establecer la especificidad y sensibilidad. El gráfico tipo ROC se desarrolló mediante el software MedCalc.

Los resultados de citotoxicidad se expresaron como media  $\pm$  SD de determinaciones por triplicado de tres experimentos independientes. El nivel de significación se evaluó mediante la prueba t de Dunnet. Los valores se indicaron con intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Graph Pad Prism 7. Finalmente, se reporta la comparación descriptiva de los datos del rendimiento del extracto de metanol de *Cinchona officinalis* para dar respuesta a las hipótesis uno y la verificación del análisis fotográfico fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC<sup>®</sup> PCS-201-018<sup>™</sup>), células de cáncer de colon HT-29 (ATCC<sup>®</sup> HTB-38<sup>™</sup>) y células de cáncer cervical HeLa (ATTC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>) para responder la hipótesis dos del estudio.

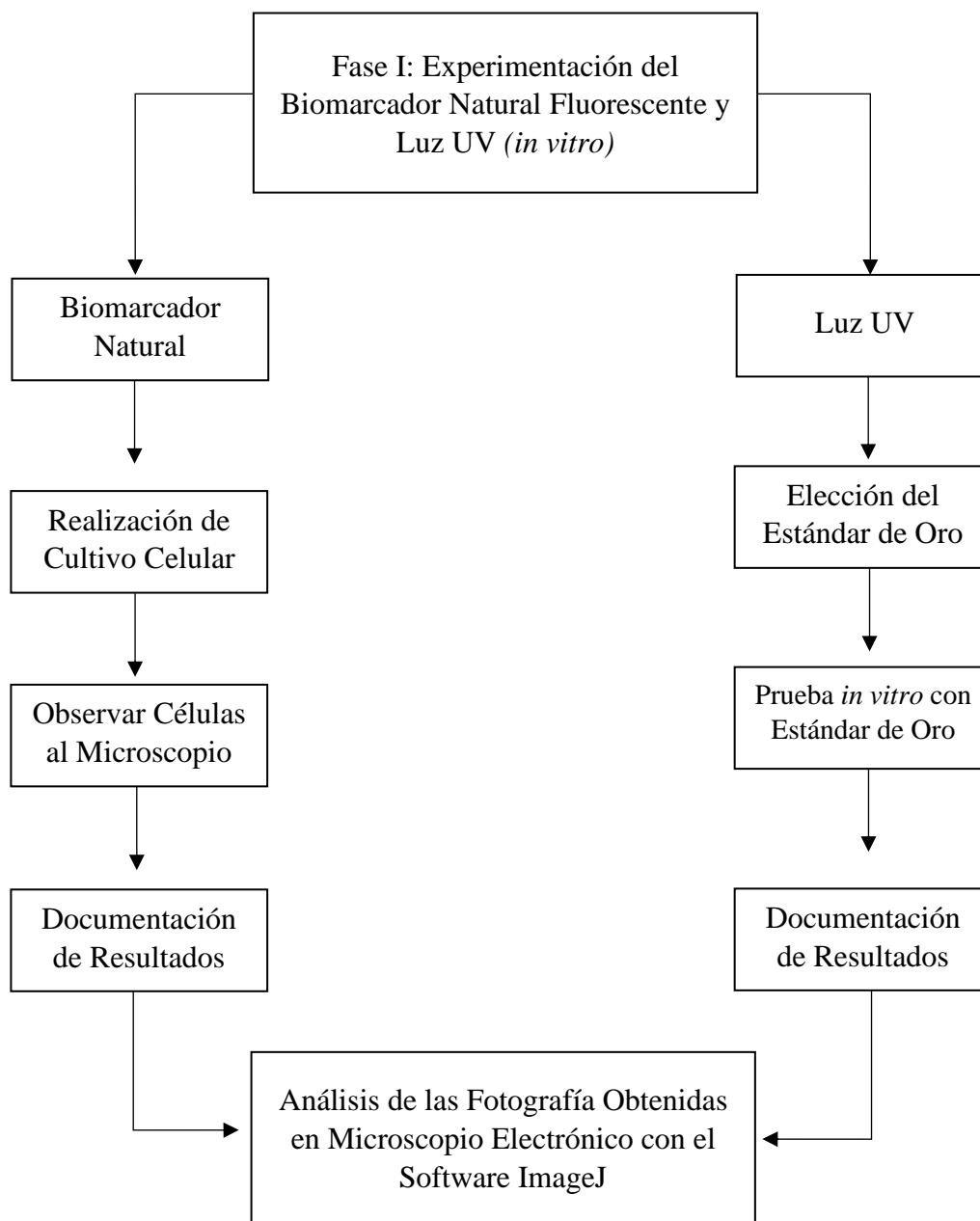


Figura 4. Diagrama de Flujo de la Fase I: Experimentación del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV (*in vitro*)



## **Fase II: Validación Discriminatoria del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV (*in vivo*)**

En esta fase se describe la metodología diseñada para la obtención de criterios de discriminación por el biomarcador natural fluorescente y luz UV a través de una intervención en población abierta.

### ***Diseño del Estudio***

Fue un ensayo clínico no aleatorizado sin grupo control, ya que son útiles en las fases tempranas de la investigación de pruebas de detección y/o diagnóstico para determinar propiedades farmacocinéticas o eficiencia de estos (Gray et al., 2016).

### ***Población, Muestra y Muestreo***

Personas mayores de 18 años, residentes en Nuevo León que formaron parte de la planta docente, estudiantil o administrativa de una institución pública de estudios superiores.

De una población de 213,628 profesores y alumnos de la UANL (2019), el tamaño de muestra se calculó con el programa G\*Power 3.1 para estudios correlacionales a población abierta con un nivel de significancia de .05, una potencia de 90% y un tamaño de efecto de mediano a grande de 0.9 (Cohen, 1988), por lo que se obtuvo una muestra de 221. Además, para asegurar la eficacia y eficiencia de la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV por cada resultado presuntivo positivo que resulte de la aplicación de éste, se le realizó una toma de raspado oral con citobrush para posterior análisis molecular por PCR, y comprobar si es un caso verdadero positivo a VPH oral.

Se empleó un muestreo por conveniencia por el hecho de ser accesible y debido a que el investigador principal reclutará a los participantes (Etikan et al., 2016).

### ***Criterios de Inclusión***

Se reclutaron hombres o mujeres mayores de 18 años, y con apertura bucal adecuada.

### ***Criterios de Exclusión***

Se excluyeron los participantes que reportaron ser alérgico a bebidas carbonatadas comerciales preguntándoselos directamente (Adams et al., 2020).

### ***Criterios de Eliminación***

Se eliminaron aquellos participantes que presenten náuseas al empleo del biomarcador natural fluorescente, o aquél participante que realizó las indicaciones propuestas de forma incorrecta como escupir, o ingerir el biomarcador natural fluorescente.

### ***Instrumentos de Medición***

A continuación, se presentan los instrumentos que se utilizaron para recolectar datos de los participantes. Se utilizó una cédula de datos sociodemográficos (Apéndice B) y un formato de lista de verificación de la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV (Apéndice C), el cual constó de número de folio del participante, resultado, hallazgos, necesidad de confirmación de diagnóstico, y necesidad de remisión para posterior atención.

### ***Procedimiento de Recolección de Datos***

Para la realización del presente estudio se solicitó autorización de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Figura 5).

**Capacitación del Personal de Apoyo.** Una vez que se obtuvo la aprobación, se procedió a la capacitación del personal de apoyo (se denominó personal de apoyo A y B) que participó. El investigador principal entrenó a dos personas del área de la salud que fungieron como personal de apoyo a través de un ejercicio de simulación entre ellos, instruyéndoles acerca del procedimiento de aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV. Se les mostró la forma de identificar resultados presuntivo positivo (áreas que tienen brillo diferente al contacto con la luz UV) o presuntivo negativo (áreas sin brillo diferente al aplicar la luz UV) para que puedan interpretarlos a

partir de las tonalidades fluorescentes en la boca. Lo anterior, se mostró al personal de apoyo a través de una presentación en PowerPoint obtenidas de la exploración documentada previa en la prueba in vitro.

Como parte final del entrenamiento, el investigador principal y el personal de apoyo A y B coincidieron en la observación de los resultados obtenidos, con la ayuda de las fotografías previamente documentadas. No hubo manual para la capacitación del personal de apoyo.

**Selección de los Participantes y Procedimientos.** Los participantes pertenecieron a diez facultades de una institución pública de estudios superiores ubicada en el campus principal de San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Se solicitó una semana antes la autorización por escrito al director de cada facultad dónde se especificó día, hora, lugar y propósito del estudio. Se contó con aproximadamente siete profesores, siete alumnos y siete personales administrativos por facultad para completar el tamaño de muestra mínimo requerido, y fueron reclutados por medio de invitación el mismo día de la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV. En el caso de profesores, la invitación fue directamente en el Departamento Escolar abordándolos al momento de firmar su asistencia, en el caso de alumnos, directamente a su llegada en el frontispicio de la facultad, y en el caso de personal administrativo en su área de trabajo.

En cualquiera de los casos anteriores, el personal de apoyo B abordó al participante y le preguntó si es alérgico a alguna bebida carbonatada comercial, si la respuesta fue no, se le invitó a participar en el estudio, se le explicó que el objetivo de este fue conocer su estado de salud oral de forma fácil, eficaz y no invasiva. Si aceptó la invitación, se llevó al participante afuera del área designada por la facultad para la realización del procedimiento, la cual pudo ser salón de clases o salón de usos múltiples, contó con las medidas de bioseguridad y sana distancia, y donde solo estuvieron el participante, personal de apoyo e investigador principal, respetando así la privacidad y confidencialidad del estudio.

Una vez que se encontró el participante en el exterior del área asignada, el personal de apoyo B le solicitó leer y firmar el consentimiento informado (Apéndice A), y llenar la cédula de datos sociodemográficos (Apéndice B). Posterior a esto, el personal de apoyo B tocó la puerta para indicar al personal de apoyo A e investigador principal que el participante se encontraba afuera de las instalaciones y que su papelería había sido llenada correctamente. El participante ingresó al interior del área designada para el procedimiento, entregó su papelería al personal de apoyo A y se le invitó a tomar asiento. El personal de apoyo B reclutó al siguiente participante.

Para llevar a cabo la aplicación del biomarcador natural fluorescente con apoyo de la luz UV, el investigador principal dio nuevamente información general del procedimiento, y solicitó al participante retirar por espacio de 15 segundos su cubrebocas, aplicó dos atomizaciones del biomarcador natural fluorescente en forma de spray al interior de la boca del participante. Se solicitó al participante no cerrar su boca por espacio de 15 segundos. El investigador principal dirigió la punta de la luz UV hacia el interior de la boca del participante sin tocar la superficie bucal, si es necesario, se pudo apoyar de abatelenguas o un espejo bucal para retraer los carrillos, y el personal de apoyo B tomó una fotografía intraoral. El material desechable empleado fue depositado en el bote de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI). El personal de apoyo B desinfectó la luz UV antes y después de cada procedimiento, para lo cual utilizó una sustancia desinfectante y posteriormente envolvió en plástico transparente (Kleen Pack<sup>®</sup>) luz UV. El investigador principal inspeccionó todas las estructuras bucales y emitió un diagnóstico presuntivo. El personal de apoyo B llenó la lista de verificación de la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV (Apéndice C) y completó la documentación del participante.

El investigador principal notificó al participante su resultado, comentando que si se obtuvo un resultado presuntivo positivo existe sospecha de una lesión, lo cual no es un dato definitivo, pero que se tomaría una muestra con un citobrush para ser analizada

por PCR y confirmar su diagnóstico. En caso de una detección presunto negativo, se invitó a seguir manteniendo su salud oral. Finalmente, el personal de apoyo B agradeció al participante por su colaboración en el estudio. El participante salió del área designada para el procedimiento donde investigador principal y personal de apoyo B sanitizaron el área y esperaron al siguiente participante.

En el caso de la obtención de un resultado presuntivo positivo o presuntivo negativo se entregó un paquete de higiene bucal que constó de cepillo, pasta, enjuague e hilo dental, y se ofreció una breve consejería relativa a temas de salud general, salud oral, medidas preventivas frente a lesiones orales potencialmente malignas, los riesgos de las ITS y las relaciones sexuales orales de acuerdo con información del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades ([CDC], 2018), momento en que el personal de enfermería y odontología desempeñaron un rol activo en el asesoramiento de los participantes y esclarecimiento de dudas. Dicha consejería tuvo una duración de 5 minutos por participante, fue realizada de manera individual y en estricta privacidad.

**Confirmación Diagnóstica.** Para corroborar la eficacia y eficiencia de la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV, se realizó una prueba de PCR a cada resultado presuntivo positivo obtenido para determinar la presencia de VPH oral siguiendo los pasos siguientes:

El ADN obtenido fue amplificado usando oligonucleótidos ITS1 e ITS4 siguiendo la metodología descrita por Chen et al. (2010). Se incluyó un control negativo con agua en lugar del ADN en el proceso de amplificación. El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 1% y visualizado en un trasiluminador de luz UV. Para la identificación, los productos de PCR fueron purificados usando un kit de purificación de fragmentos de ADN. El producto purificado fue secuenciado en la Unidad de Formulación de Biológicos, Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas, Laboratorio de Inmunobiología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, mediante el método basado

en fluorescencia Taq FS Dve Terminador, utilizando el secuenciador PCR-164S/ Ruby Taq Master (2x). 4 x 1,25 ml (2x conc.) Ready-to-Use Mixes for PCR. Adicionalmente se emplearon PCR-269S/ LE Agarose, y M-214S/ 100 bp DNA Ladder. 100 bp to 1 kb log scale. 500 µl (105 ng/µl) ready-to-use.

### ***Consideraciones Éticas***

Este estudio se apegó al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Secretaría de Salud, 1987; enmienda 2014) que estableció los lineamientos y principios generales a los que se debe someter la investigación científica. Se consideró el título segundo, los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, haciendo énfasis en los siguientes artículos.

Se solicitó autorización de la Comisión de Ética en Investigación de la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León y se pidió autorización de la Institución Pública participante (Artículo 14, Fracción VII; Fracción VIII). De acuerdo con el Artículo 16, se mantuvo en todo momento el anonimato de los participantes, omitiendo su identidad ya que fueron identificados solamente por un número de código asignado por el investigador al cual sólo tuvo acceso él y el director de tesis.

En todo momento prevaleció el criterio de respeto a la dignidad y a la protección de los derechos y bienestar (Artículo 13). Se protegió la privacidad de los participantes al designar un área exclusiva sin ruido y libre de distracciones para el procedimiento propuesto, en donde se encontró solo el participante, personal de apoyo A y B e investigador principal. Se le dio el derecho de negarse a participar o contestar la cédula de datos sociodemográficos y a que sus preguntas sean resueltas.

De acuerdo con el Artículo 20 se acordó la participación de los sujetos por medio de un consentimiento informado (Apéndice A) por escrito en donde se especificó toda la información necesaria para que el participante pudiera decidir con pleno conocimiento sobre los procedimientos y riesgo de su participación sin omisión alguna, el sujeto acordó su participación al firmarlo (Artículo 14, Fracción V).

Respecto al artículo 21, los participantes del estudio recibieron una explicación clara y completa de la investigación y pudieron realizar preguntas si existieran dudas (Fracción I); los procedimientos que surgieran y su propósito (Fracción II); que su contribución fue importante para la generación de un método de detección de lesiones orales potencialmente malignas, pudo confirmar su estado de salud oral, y que recibió como compensación a su participación un paquete de higiene bucal (Fracción IV); la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a dudas (Fracción VI), la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio sin afectar sus labores dentro de la institución pública de estudios superiores (Fracción VII); y la seguridad de que no se identificará y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad (Fracción VIII). Todo lo anterior quedó plasmado en el consentimiento informado (Apéndice A).

Conforme al Artículo 17, Fracción II, donde se consideró el riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio, esta investigación se clasifica como categoría II investigación con riesgo mínimo, ya que no se ha reportado ningún efecto adverso por realizar pruebas con bebidas preparadas con los elementos de la presente invención.

### ***Consideraciones de Bioseguridad***

Las consideraciones de bioseguridad de la Fase II fueron las mismas que la Fase Preliminar y Fase I agregando las siguientes consideraciones.

De conformidad con el Artículo 62 se solicitó autorización del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León presentando protocolo de investigación con análisis objetivo, y completo de los riesgos del estudio (Fracción I), se solicitó una carta de aceptación de la institución pública de estudios superiores donde se reclutaron a los participantes (Fracción II), se procedió a la fase *in vivo* hasta contar con las debidas autorizaciones de los Comités correspondientes

(Fracción III), fue utilizada una mesa, una silla con respaldo y descansa brazos, materiales para asepsia y antisepsia, contenedor de RPBI, bolsa plástica para recolectar basura, abatelenguas, citobrush y barreras de protección personal para el investigador principal y personal de apoyo (Fracciones IV a VII).

Para respetar el Artículo 64, el investigador principal estuvo obligado a informar todo efecto adverso que se presentara relacionado con la investigación (Fracción I), la institución pública de estudios superiores reportó los incidentes ante Secretaría de Salud (Fracción II), el comité de ética pudo cancelar el procedimiento si así lo determinara (Fracción III), y se emitiera un informe correspondiente en caso de cancelación (Fracción IV).

Conforme al Artículo 75, se contó con las instalaciones y equipo de laboratorio necesario para procesar las muestras de PCR (Fracción I), el investigador contó con un manual elaborado por la UOIE-CIDICS, dónde se especificaron los procedimientos de laboratorio (Fracción II), el investigador principal y personal de apoyo cotaron con adiestramiento sobre la manipulación, manejo, transporte, descontaminación, y eliminación de desechos (Fracción III), se determinó la necesidad de vigilancia médica entre el personal involucrado (Fracción IV), se estableció un programa de supervisión de laboratorio estipulado por la UOIE-CIDIS (Fracción V), se contó con bibliografía actualizada referente a seguridad en equipos de laboratorio, disponibilidad de sistemas de contención, normas y reglamentos (Fracción VI), y se cumplieron con las determinaciones que el comité dispusiera en materia de bioseguridad (Fracción VII).

De acuerdo con el Artículo 83, Fracción I, se determinó como riesgo real de la investigación la necesidad de realizar un máximo de dos enjuagues del biomarcador natural fluorescente. El riesgo potencial de la investigación en materia de bioseguridad fue la posibilidad de ingerir accidentalmente el biomarcador, en cuyo caso no habría complicación debido a la naturaleza de los componentes de la misma. En cuanto a la exposición a la luz UV, esta fue considerada como riesgo nulo debido a la baja



intensidad de la luz y el corto tiempo requerido para visualizar las lesiones orales potencialmente malignas y toma de fotografía intraoral si fuese el caso. Además, debido a la anatomía de la boca, el paciente no visualizó el haz de luz, y el participante como el personal encargado de realizar la prueba de detección utilizó lentes con protección UV. Estos riesgos fueron dados a conocer a los participantes antes de firmar el consentimiento informado.

Respecto al Artículo 83, Fracción II, en caso de presentar algún síntoma como enrojecimiento, calor o alergia en cavidad oral, el participante estuvo obligado a comunicarlo con el investigador principal, mismo que se encargó de referirlo a su clínica asignada para recibir atención médica.

El procedimiento de detección de lesiones orales potencialmente malignas a través del biomarcador natural fluorescente y utilización de luz UV fue realizado en las instalaciones de la institución pública de salud asignada para ello, cuidando que tenga un flujo escaso de personas, con iluminación, ventilación e higiene adecuada para el procedimiento. Fue utilizada una mesa, una silla con respaldo y descansa brazos, materiales para asepsia y antisepsia, contenedor de RPBI, bolsa plástica para recolectar basura, abatelenguas, citobrush y barreras de protección personal para el investigador (Artículo 83, Fracciones III a V).

Para respetar el Artículo 83, Fracción IV, el manejo del RPBI se realizó de acuerdo con la NOM 087-ECOL-SSA1-2002, al adquirir una bolsa de color rojo para depositar los abatelenguas, citobrush y envases después de haber sido utilizados para la realización del enjuague y hayan estado en contacto con el paciente. Para el traslado del biomarcador natural fluorescente fueron empleados envases de vidrio color ámbar con atomizador, colocados en hielera para conservar las propiedades del producto. Respecto con el Artículo 84 se anexó la calendarización del procedimiento para su verificación por parte del comité de bioseguridad.

### *Plan de Análisis de Datos*

Para responder al objetivo tres que es obtener criterios de discriminación por el biomarcador natural fluorescente en cavidad oral en población general, se evaluó el perfil sociodemográfico de los participantes con y sin fluorescencia ante la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV. Respecto al objetivo cuatro que es determinar las características que determinan padecer lesiones orales potencialmente malignas de participantes en población abierta, se procedió a evaluar las diferencias en la población con VPH mediante tablas de contingencia, y se realizaron las pruebas de chi-cuadrado y exacta de Fisher para las variables nominales; para las variables numéricas se utilizó la prueba t de Student. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v22.

Finalmente, se reporta la comparación descriptiva de los datos acerca si fumar tabaco, beber alcohol, presencia de comorbilidades y contar con antecedentes heredofamiliares de cáncer son factores de riesgo significativos para la presencia de lesiones orales potencialmente malignas a través del empleo del biomarcador natural fluorescente y luz UV, y si el sitio de fluorescencia es una característica que determina padecer VPH oral para dar respuesta a las hipótesis tres y cuatro del estudio.

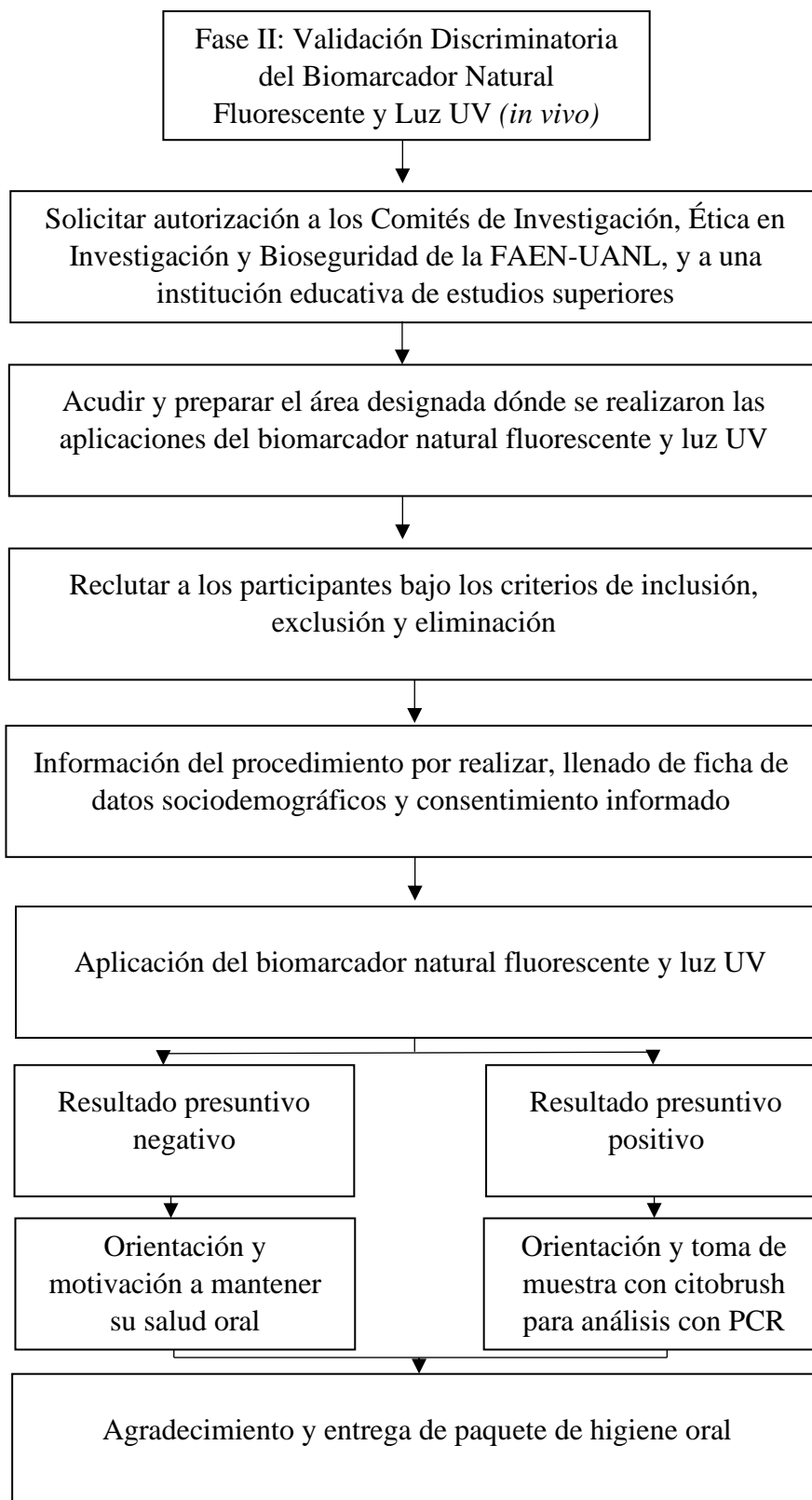


Figura 5. Diagrama de Flujo de la Fase II: Validación Discriminatoria del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV (*in vivo*)

## Capítulo III

### Resultados

En este capítulo se reportan los resultados obtenidos del estudio de acuerdo a los objetivos planteados. Los resultados de la Fase Preliminar se encuentran en apéndices. Primero, se muestran los resultados de pruebas de biocompatibilidad del biomarcador natural fluorescente en un modelo *in vitro* de células sanas, y luego los resultados acerca de la sensibilidad y especificidad del biomarcador natural fluorescente validado en un modelo *in vitro* de células malignas. Posteriormente, los resultados obtenidos de la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV en cavidad oral de personas en población abierta. Al finalizar cada apartado, se exponen los resultados para dar respuesta a las hipótesis del estudio.

#### **Biocompatibilidad del Biomarcador Natural Fluorescente**

En respuesta al primer objetivo específico que fue determinar la biocompatibilidad del biomarcador natural fluorescente en un modelo *in vitro* de células sanas, se obtuvo el nivel de significancia mediante la prueba *t* de Student utilizando el programa Graph Pad Prism. Los resultados mostraron un rendimiento del 23% (13.8 g) del extracto de metanol de *Cinchona officinalis*. Este extracto causó una citotoxicidad significativa ( $p < 0.01$ ) de hasta el 5% contra células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC<sup>®</sup> PCS-201-018<sup>TM</sup>), en comparación con la inducida por el control de NaOCl al 5%<sup>1</sup> (Figura 6). Lo anterior, se traduce en la posibilidad de emplear la solución en una concentración de hasta 250 µg/mL sin causar efectos no deseados.

Respecto a la hipótesis uno que indica el biomarcador natural fluorescente muestra un rendimiento mínimo del 20% del extracto de metanol de *Cinchona officinalis*, se realizó una comparación descriptiva de los datos. En el presente estudio se

---

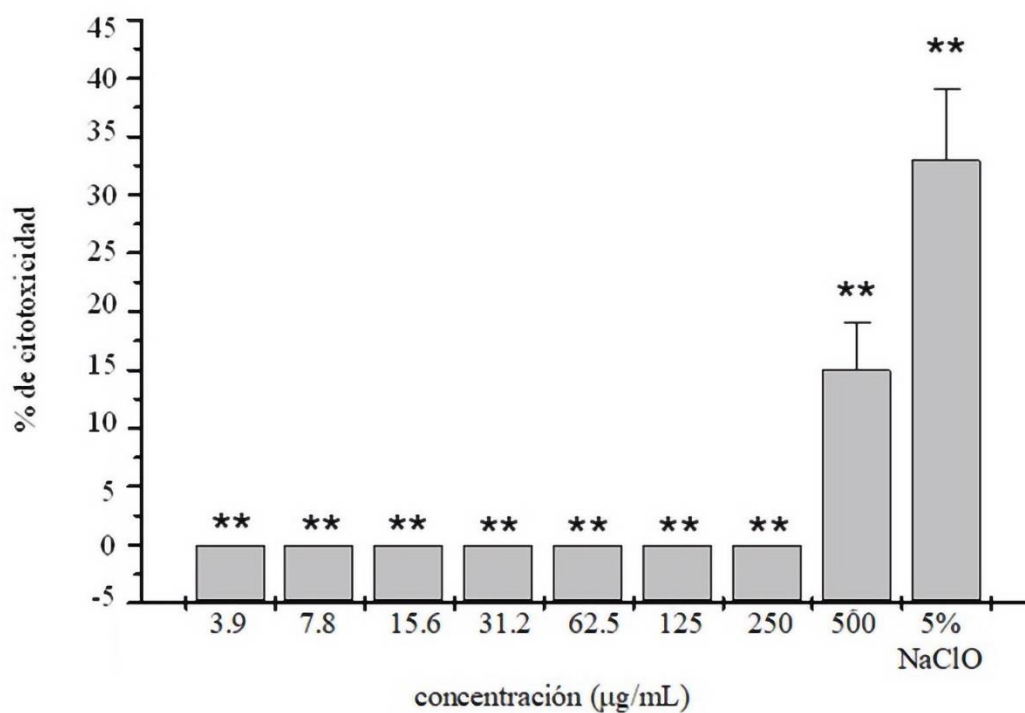
<sup>1</sup> NaOCl al 5%: hipoclorito al 5%. Líquido ampliamente utilizado en tratamientos odontológicos, elegido como control debido a la naturaleza de su uso.

obtuvo un rendimiento mayor del 23% superando el valor hipotético por tres puntos, por lo cual se acepta la hipótesis.

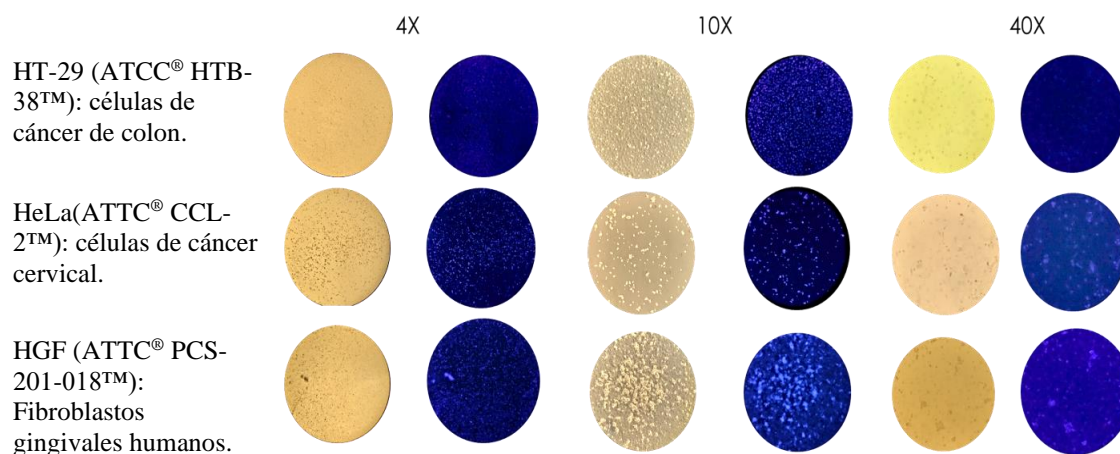
### **Sensibilidad y Especificidad del Biomarcador Natural Fluorescente**

De acuerdo al segundo objetivo específico, evaluar la sensibilidad y especificidad del biomarcador natural fluorescente validando los datos en un modelo *in vitro* de células malignas. Se seleccionó la concentración no tóxica de 250 µg/mL para realizar experimentos sobre la intensidad de fluorescencia en las células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™), células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) y células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™). Se observó disminución significativa ( $p < .05$ ) de la fluorescencia en células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™), en comparación con la de las células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™) y células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™). El co-cultivo de ambas células mostró afinidad selectiva por las células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™) y células de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™), mostrándose un aumento de la fluorescencia. Dichos resultados fueron documentados a 4, 10 y 40x (figura 7 y 8). Lo anterior, se traduce en la afinidad del biomarcador natural fluorescente por células cancerígenas.

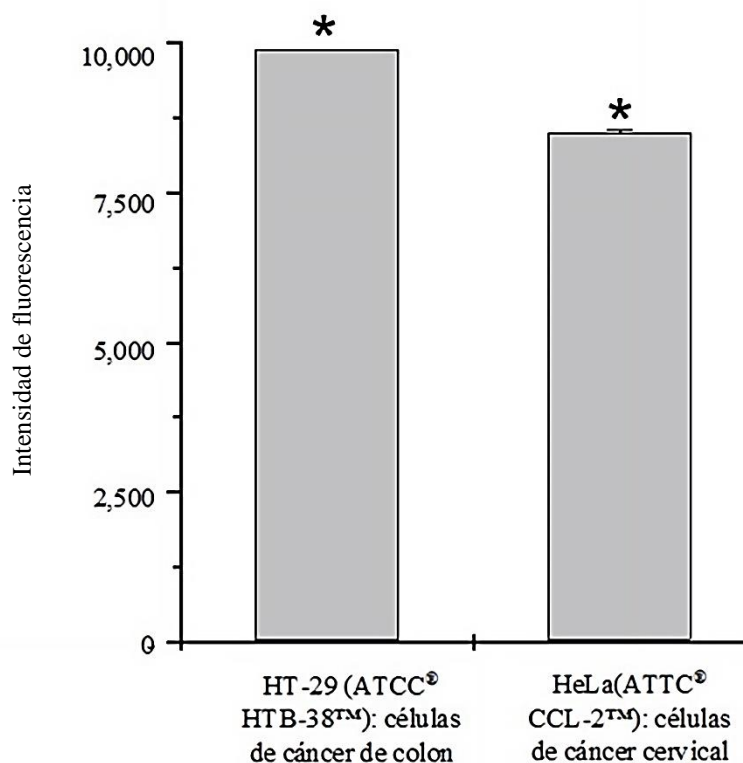
En cuanto a la hipótesis dos que indica el biomarcador natural fluorescente presenta diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia en células malignas y no malignas en las pruebas *in vitro* realizadas, se verificó el análisis fotográfico de la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV en fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™) y células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™). Los resultados mostraron disminución significativa ( $p < .05$ ) de la fluorescencia en células control, ante lo anterior se acepta la hipótesis.



*Figura 6.* Citotoxicidad del extracto metanólico de *C. officinalis* contra células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™). Los datos representan la media  $\pm$  SD de triplicados de tres experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ , en comparación con el control de NaClO al 5%. La DO del control no tratado fue de  $1.29 \pm 0.15$ .



*Figura 7.* Fotografías de la evaluación mediante microscopía óptica del biomarcador natural fluorescente y luz UV a 4, 10 y 40X. Obsérvese el aumento de fluorescencia en células cancerígenas mostrando la afinidad del biomarcador natural fluorescente por este tipo de células.



*Figura 8.* Análisis del densitograma del extracto metanólico de *C. officinalis* en células tumorales y normales. Los datos representan la media  $\pm$  SD de triplicados de tres experimentos independientes. \* $p < .05$ .

### **Criterios de Discriminación por el Biomarcador Natural Fluorescente**

Para dar respuesta al objetivo tres obtener criterios de discriminación por el biomarcador natural fluorescente en cavidad oral de participantes en población abierta, se obtuvo lo siguiente: características sociodemográficas como edad, sexo, estado civil, ocupación, así como factores de riesgo como fumar, beber alcohol, presencia de lesiones orales, diagnóstico de enfermedades, antecedentes heredofamiliares de cáncer, además sitio de fluorescencia.

Un total de 305 participantes fueron incluidos en este estudio. Entre ellos, el 77.8% (210/305) eran mujeres y el 22.2% (95/305) eran hombres. La media de edad de los participantes era de  $38 \pm 13.6$  años. El 49.2% (150/305) declaró ser soltero y la ocupación con mayor porcentaje fue personal administrativo con el 73.4% (224/305) de los casos.

La información pertinente a factores de riesgo (consumo de alcohol y tabaco, presencia de comorbilidades y antecedentes heredofamiliares de cáncer) de cada participante fue recogida por el personal de apoyo mediante un cuestionario y se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1

*Distribución de Participantes por Factores de Riesgo*

Factor de Riesgo	Frecuencia	Porcentaje (%)	$\chi^2$	gl	$p^1$
Fumar tabaco	64	21.0	200.65	1	.001
Beber alcohol	143	46.9	74.54	1	.001
Presencia de Comorbilidad					
Hipertensión	25	8.2	9.05	1	.033
Diabetes	20	6.6	20.21	1	.001
Endometriosis	8	2.6	22.39	1	.001
Presencia de antecedentes heredofamiliares de cáncer	100	32.8	1.05	1	.314

*Nota. N = 305, se aplicó prueba de  $\chi^2$  de Pearson*

Todas las muestras, incluido el ADN de las células HeLa, mostraron el esperado ~203 bp amplicón del gen de la  $\beta$ -actina. Además, en la PCR anidada para VPH, el amplicón esperado de ~150 pb no se observó en agua libre de nucleasas, sino en el ADN de las células HeLa. Los individuos positivos al VPH presentaron el fragmento de ADN de ~150 pb en la PCR anidada.

En relación a la hipótesis tres que indica fumar tabaco, beber alcohol, presencia de comorbilidades y contar con antecedentes heredofamiliares de cáncer son factores de riesgo significativos para la presencia de lesiones orales potencialmente malignas a través del empleo del biomarcador natural fluorescente y luz UV, se realizó una comparación descriptiva de los datos dónde se obtuvo que fumar tabaco, beber alcohol y presencia de comorbilidades son factores significativos ( $p < .05$ ), sin embargo, el contar



con antecedentes heredofamiliares de cáncer no ( $p < .314$ ), motivo por el que se rechaza la hipótesis.

### **Características que determinan padecer lesiones orales potencialmente malignas**

Para dar respuesta al objetivo cuatro analizar las características que determinan padecer lesiones orales potencialmente malignas de participantes en población abierta, se obtuvo lo siguiente: en la aplicación del biomarcador, el 20.62% (63/305) presentó fluorescencia. De estos, el 84.13% (53/63) eran mujeres y el 15.87% (10/63) eran hombres, mientras que la media de edad era de  $37 \pm 13.83$  años. El 55.6% (35/63) eran solteros y la ocupación con mayor porcentaje fue personal administrativo con un 69.8% (44/63). Existió asociación estadística entre la presencia de fluorescencia a la aplicación del biomarcador y el consumo de alcohol ( $p < .001$ ) y el hábito de fumar tabaco ( $p < .001$ ), pero no con la presencia de comorbilidades ( $p = .458$ ). La información pertinente a sitio de presencia de fluorescencia se presenta en la Tabla 2.

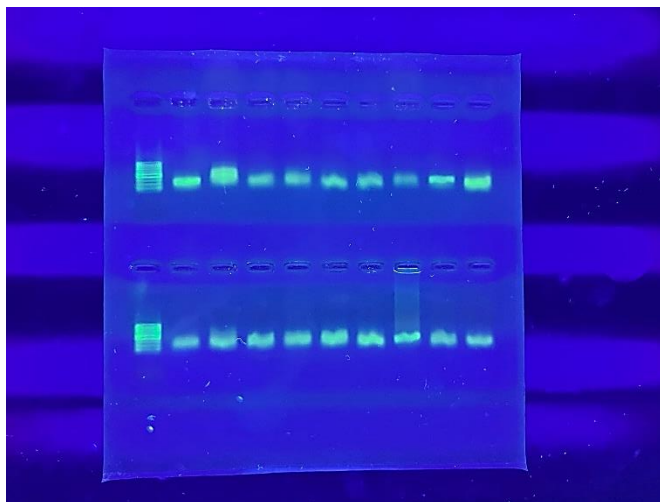
Tabla 2

*Distribución de Participantes con Presencia Fluorescencia a la Aplicación del Biomarcador Natural por Sitio de Fluorescencia*

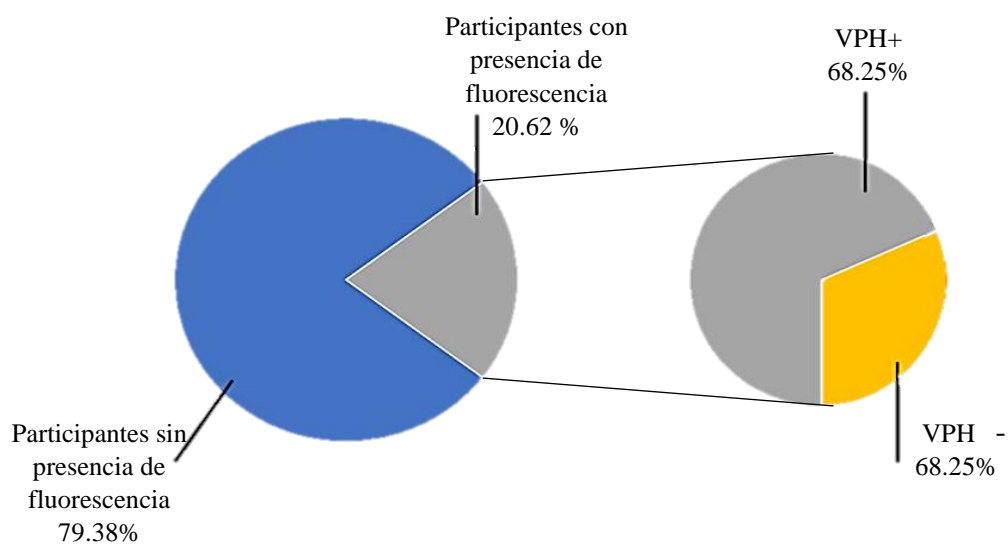
Característica	Evaluados mediante PCR		<i>p</i>
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Sitio de Fluorescencia			.004
Lengua	5 (11.63)	4 (20.00)	
Piso de boca	3 ( 6.98)	1 ( 5.00)	
Paladar	4 ( 9.30)	0 ( 0.00)	
Encía	9 (20.93)	3 (15.00)	
Mucosa bucal y vestíbulo	22 (51.16)	12 (60.00)	

*Nota. n = 63, se aplicó prueba de  $\chi^2$  de Pearson*

Ante las pruebas confirmatorias de PCR (figura 10), se observó una prevalencia de infección por VPH oral del 68.25% (43/63) en los participantes con presencia de fluorescencia (Figura 9 y 10). El porcentaje de infección por VPH oral para mujeres y hombres fue del 82.9% (34/41) y del 40.9% (9/22), respectivamente.



*Figura 9.* Amplificación del gen de VPH mediante PCR. Obsérvese el marcador de pares de bases (superior) y resultado (inferior). La presencia de líneas fluorescentes en inferior marca la positividad a VPH



*Figura 10.* Distribución de participantes positivos y negativos ante pruebas confirmatorias de PCR

La media de edad de los individuos con VPH oral fue de  $36.81 \pm 14.2$  años. Referente al sexo, estado civil y ocupación, el 86.05% (37/43) eran mujeres y el 13.95% (6/43) eran hombres. El 51.81% (24/43) eran solteros y la ocupación con mayor porcentaje fue personal administrativo con 62.77% (33/43).

Se observó asociación estadística entre la infección por VPH oral y el consumo de alcohol ( $p = .001$ ) y el hábito de fumar tabaco ( $p < .001$ ) (Figura 11 y 12). Respecto a la presencia de comorbilidades, se encontraron en un 88.37% (38/43) de los participantes, mostrándose como un dato estadísticamente significativo ( $p = .001$ ). Las enfermedades más prevalentes fueron diabetes con 16.28% (7/43), e hipertensión y endometriosis con 11.63% (5/43) cada una.

La relación de la infección oral por VPH oral y los antecedentes heredofamiliares de cáncer fueron evaluados; el 37.21% (16/43) declaró tener estos antecedentes ( $p = .212$ ). La distribución por tipo de cáncer se presenta en la Tabla 3. Las lesiones de la cavidad oral se identificaron clínicamente en 4 individuos infectados por VPH oral. No se mostró diferencia significativa ( $p = .876$ ). Respecto al sitio de fluorescencia, el 51.16% (26/43) presentó fluorescencia en mucosa y vestíbulo bucal. Se encontró una diferencia significativa en la presencia y sitio de fluorescencia ( $p = .004$ ) (Tabla 2).

Para dar respuesta a la hipótesis cuatro que indica el sitio de fluorescencia es una característica que determina padecer VPH oral, se realizó una comparación descriptiva de los datos, encontrando que el sitio de fluorescencia influye significativamente en los participantes positivos a VPH oral mediante pruebas moleculares de PCR ( $p < .05$ ), por lo que se acepta la hipótesis.

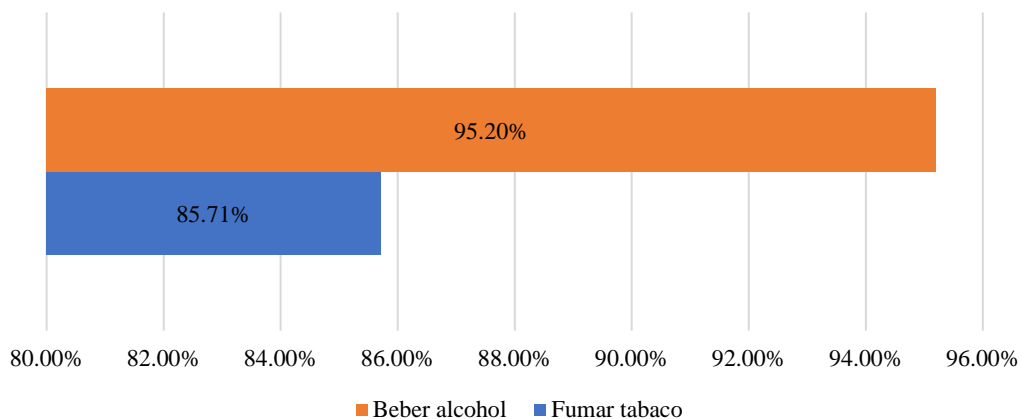


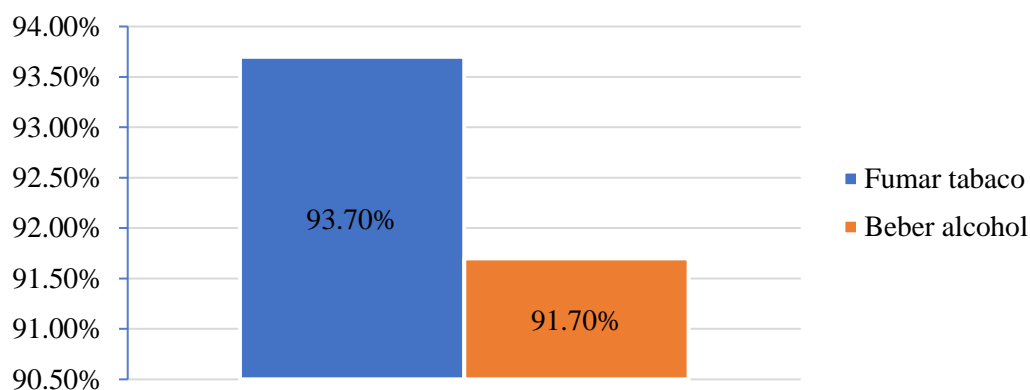
Figura 11. Participantes con presencia de fluorescencia que declaran fumar y beber alcohol

Tabla 3

*Distribución de Participantes Evaluados mediante PCR por Tipo de Antecedente Heredofamiliar de Cáncer*

Característica	Evaluados mediante PCR				<i>p</i>
	Positivos ( <i>n</i> = 43)		Negativos ( <i>n</i> = 20)		
	Frecuencia	Porcentaje (%)	Frecuencia	Porcentaje (%)	
Mama	9	14.28	3	4.76	.001
Vejiga	1	1.59	0	0.00	
Riñón	2	3.17	0	0.00	
Cerebral	0	0.00	1	1.59	
Estómago	4	6.35	1	1.59	
Próstata	4	6.35	0	0.00	
Colon	2	3.17	0	0.00	
Cervical	22	34.92	6	9.52	.001
Pulmón	2	3.17	0	0.00	
Leucemia	1	1.59	0	0.00	
Colon	2	3.17	0	0.00	
Páncreas	2	3.17	0	0.00	
Útero	0	0.00	1	1.59	.001

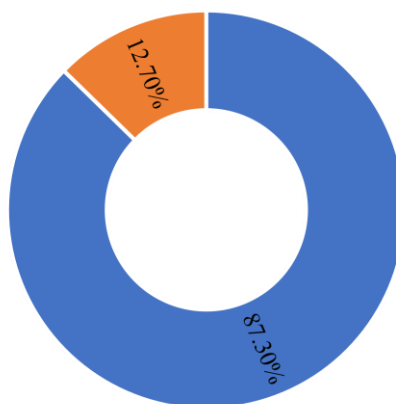
Nota. *n* = 63, se aplicó prueba de  $\chi^2$  de Pearson



*Figura 12.* Participantes con presencia de fluorescencia que declaran fumar y beber alcohol al menos una ocasión por semana

Se encontró que el 87.3% de los participantes contaban con diagnóstico médico de alguna enfermedad (figura 13). La distribución por tipo de enfermedad se muestra en la Tabla 4.

- Participantes con diagnóstico médico de enfermedad
- Participantes sin diagnóstico médico de enfermedad



*Figura 13.* Participantes con presencia de fluorescencia que cuentan con diagnóstico médico de alguna enfermedad

Tabla 4

*Distribución de Participantes Evaluados mediante PCR por Tipo de Enfermedad Preexistente*

Característica	Evaluados mediante PCR				p
	Positivos (n = 43)		Negativos (n = 20)		
	Frecuencia	Porcentaje (%)	Frecuencia	Porcentaje (%)	
Hipertensión	7	11.11	2	3.18	.033
Diabetes	4	6.35	0	0.00	
Hipotiroidismo	2	3.18	0	0.00	
Rinitis Alérgica	0	0.00	1	1.59	
Endometriosis	5	7.94	2	3.18	.001
Epilepsia	1	1.59	0	0.00	
Diabetes	9	14.28	3	4.76	.001
Hipotensión	1	1.59	0	0.00	
Diabetes/ Hipertensión	0	0.00	1	1.59	
Hipertiroidismo	4	6.35	2	3.18	
Artritis	3	4.76	0	0.00	
Reumatoide	3	4.76	0	0.00	
Hipotiroidismo	1	1.59	2	3.18	
Asma	4	6.35	0	0.00	
Ninguna	3	4.76	6	9.52	.

*Nota. n = 63, se aplicó prueba de  $\chi^2$  de Pearson*

## Capítulo IV

### Discusión

El propósito del estudio fue desarrollar y probar un biomarcador natural fluorescente en forma de solución y una luz UV para su revelado, con características no intrusivas y de menor costo que los disponibles hasta hoy. A continuación, se discuten los resultados obtenidos de cada uno de los objetivos planteados. Posteriormente se presentan las limitaciones del estudio, conclusiones, y recomendaciones.

Respecto a la biocompatibilidad del biomarcador natural fluorescente en un modelo *in vitro* de células sanas, se documentó un rendimiento alto del extracto de metanol de *Cinchona officinalis*. Dicho dato, supera lo reportado por autores como Gurung y De (2017) y Arsene et al. (2021), quienes reportaron rendimientos similares. Lo anterior, podría atribuirse en gran medida a la calidad del material e insumos, su propósito de uso, las condiciones de laboratorio y/o la experiencia del personal, que trae consigo repercusiones directas al momento del procesamiento de los materiales (Liao, Li & Tjong, 2018; Jalali et al., 2021).

En relación a la evaluación de la sensibilidad y especificidad del biomarcador natural fluorescente validando los datos en un modelo *in vitro* de células malignas, se reportó una disminución significativa de la fluorescencia en células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC<sup>®</sup> PCS-201-018<sup>™</sup>), en comparación con la de las células cancer cervicales HeLa (ATTC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>) y células de cáncer de colon HT-29 (ATCC<sup>®</sup> HTB-38<sup>™</sup>). Esto es consistente con los datos reportados por Hasibuan et al. (2021), quienes argumentan que el extracto de *Cinchona Officinalis* es viable para visualizar células en cultivos celulares. Cabe resaltar, que no existen estudios similares donde se empleen el mismo tipo de células que las aquí empleadas, sin embargo, se constata el uso *in vitro* que comprende este extracto en la detección de microorganismos (Arsene et al., 2021; Gurung & De., 2017; Hema et al., 2019; Liao et al., 2018).

En cuanto a la obtención de criterios objetivos de discriminación por el biomarcador natural fluorescente en cavidad oral de pacientes en población abierta, se encontró que aproximadamente una quinta parte del total de la muestra presentó fluorescencia a la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV. Lo anterior, discrepa con los datos reportados por Sánchez-Santillán (2020), quienes encontraron datos superiores al evaluar la influencia de los sustratos y las concentraciones de ácido indol butírico (AIB) en la propagación vegetativa de *Cinchona officinalis*. Cabe resaltar que no existen estudios similares donde se apliquen extractos procesados de la raíz propuesta en población general, sin embargo, la diferencia en los anteriores datos podría verse influenciado por la calidad del material e insumos, su propósito de uso y/o las condiciones del estudio planteado (Liao et al., 2018).

Abordando las características que determinan padecer lesiones orales potencialmente malignas de participantes en población abierta, en nuestro estudio, no hubo diferencias significativas en la media de edad de los individuos infectados y no infectados por el VPH oral. Lo anterior, coincide con datos reportados por Gipson et al., 2018, quienes investigaron la infección por VPH oral entre las mujeres remitidas a colposcopia. Sin embargo, si se encontró diferencia significativa entre el consumo de alcohol y tabaco, lo cual coincide con algunos autores, quienes indagaron en el consumo de estas sustancias y la presencia del VPH oral (Auguste & Deloumeaux, 2020).

Por otro lado, en este estudio se demostró que la historia familiar de cáncer y el padecer comorbilidades tiene un valor significativo en la infección por VPH oral, dicho dato concuerda por lo estipulado por (Antonsson et al., 2021), quienes indagaron en la historia natural de esta infección. Respecto al sitio de fluorescencia, en el presente estudio se reportó que cerca de la mitad de los casos se localizaron en mucosa y vestíbulo bucal, lo cual coincide con lo reportado por un estudio realizado en Macedonia, quienes documentaron el caso de una mujer de 45 años a quien se le realizó



una detección neoplásica con un aditamento tecnológico en ese mismo sitio (Nikolovski et al., 2021).

Aunado a lo anterior, diversos autores coinciden al declarar la mucosa bucal como el principal sitio de presencia en cambio de tonalidad al aplicar un instrumento infrarrojo y fluorescente respectivamente (Tatehara & Satomura, 2020; Wang & Wang, 2021). Más aún, un estudio realizado en Canadá expone la mucosa bucal como el sitio más prevalente a ser irradiado en el uso de la visualización por fluorescencia en cirugías guiadas (Durham et al., 2020). Sin embargo, nuestros datos contrastan con los resultados obtenidos por algunos autores quienes documentaron lengua como el sitio más afectado y mucosa bucal en segundo lugar (Morikawa et al., 2020).

Asimismo, en el presente estudio se obtuvo el hallazgo de contar con presencia de fluorescencia en participantes con abundante placa dentobacteriana (PDB), la cual es restos de alimentos en proceso de descomposición en cavidad oral. Esto se documentó en un número bajo de participantes, y todos contaban con la peculiaridad de haber consumido alimentos previamente y no haber realizado rutina de cepillado oral previo a la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV, lo cual, contrasta con los autores que han trabajado con proyectos similares en el tema, puesto que no ha sido documentado (Morikawa et al., 2020; Nikolovski et al., 2021; Tatehara & Satomura, 2020; Wang & Wang, 2021).

Continuando con la idea anterior, en este proyecto también se encontró que la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV reveló el sarro dental de algunos participantes. Esto fue algo sobresaliente, ya que las tonalidades fluorescentes en este tejido eran diferentes a las encontradas en epitelio bucal. A su vez, se destaca los curiosos casos de un limitado número de participantes quienes contaban con presencia de sarro dental y PDB simultáneamente, y presentaron fluorescencia en diferentes tonalidades en las antes mencionadas estructuras. Lo anterior, no ha sido reportado por

autores previamente (Morikawa et al., 2020; Nikolovski et al., 2021; Tatehara & Satomura, 2020; Wang & Wang, 2021).

### **Limitaciones del Estudio**

La principal limitación de este estudio es que, al momento de la propuesta de investigación, existió muy poca literatura científica relacionada con los temas aquí estudiados, es decir, con las líneas celulares y condiciones propuestas, lo que dificultó determinar la documentación completa. Por esta razón, se decidió ampliar el estudio de la literatura abordando áreas relacionadas que pudieran ayudar a enriquecer este estudio.

En segundo lugar y continuando con la propuesta de métodos innovadores para detectar lesiones orales potencialmente malignas, se sugiere a los investigadores interesados en el área acercarse a esta área de conocimiento y probar otras variantes de la raíz utilizada para estudiar su relación costo-efectividad, capacidad de detección, sensibilidad y especificidad a largo plazo. Es importante continuar implementando biomarcadores como el aquí empleado en muestras más grandes, teniendo en cuenta contar con todo el equipo necesario y calibración de personal.

El método utilizado es apropiado para el tipo de estudio y las variables a medir, ayudando a llegar a la población estimada y lograr las metas. Así mismo, mediante herramientas de aplicación de entrevistas se pueden evaluar adecuadamente variables de interés, pero al analizar los resultados surgen nuevas variables, por lo que se propone reformar los instrumentos empleados para obtener la mayor información posible para contribuir al beneficio de la ciencia.

En la Fase I se observó una considerable demora en el procedimiento de cultivación de células, ya que tanto la preparación del medio de cultivo como la esterilización de las puntas de micropipeta fueron realizadas el mismo día que iniciaría el estudio. Por otro lado, el proceso también se vio ralentizado debido al agotamiento de algunos materiales como el alcohol empleado para desinfectar, y pipetas de 25 ml. Lo

anterior, debido a una demora en los procesos globales de entrega de mercancías a causa de la pandemia por COVID-19.

Durante la Fase II, se encontró una mayor participación de personal administrativo en comparación con personal docente y estudiantes, motivo por el cual debería tomarse con cautela la generalización de los resultados que pudiera emanar. Por otro lado, el proceso de aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV demoró más de lo planeado debido a falta de personal de apoyo, además, en algunos lugares donde fue llevado a cabo el procedimiento no se pudo oscurecer por completo el área al momento de la utilización de la luz UV, motivo por el cual podría no haberse visto de manera adecuada el contraste esperado en cavidad oral.

### **Conclusiones**

Estos resultados demostraron la viabilidad del uso de extractos de *C. officinalis* para la identificación temprana de lesiones orales potencialmente malignas, dada su selectividad para las células cancerosas y la ausencia de toxicidad para las células control. Los biomarcadores representan una oportunidad no sólo para el diagnóstico, sino también para el potencial de identificar o explorar complejos mecanismos fisiopatológicos de una manera simple y mínimamente invasiva, sin arriesgar al paciente. El extracto de metanol de *C. officinalis* no es tóxico, lo que permitió su uso en población abierta evitando efectos secundarios.

Se demuestra que biomarcadores naturales como los extractos de metanol de *C. officinalis* pueden ser utilizados en la práctica clínica habitual para la identificación temprana de lesiones orales potencialmente malignas, dada su selectividad y compatibilidad con las células tumorales en estudios *in vitro*. Pueden representar una alternativa para una detección rápida y sencilla, especialmente por parte del personal sanitario en regiones donde los servicios médicos carecen de equipos de alta tecnología.

Los alcaloides de la quina han sido hasta ahora una de las clases de productos naturales más extraídas, exploradas, utilizadas e investigadas, siendo la quinina la

molécula estrella de esta clase. Sus numerosas aplicaciones en diversos campos como la medicina, la síntesis, la catálisis y las bebidas son un testimonio de su potencial. Han sido de suma importancia para la humanidad, con su aparición como catalizadores supremos en el área de las transformaciones asimétricas en la última década, junto con el continuo interés de los biólogos por sus propiedades medicinales, los alcaloides de la quina tienen un futuro glorioso en los próximos días.

Indagar en mecanismos naturales para la detección de lesiones orales potencialmente malignas marcó una pauta para el desarrollo del biosensor natural fluorescente, inclusive empleando elementos no nativos de México. Esto requirió tiempo y un gasto económico considerable principalmente debido a la pandemia por COVID-19 y el ralentizamiento en la demora de entrega de insumos del exterior. Algunas demoras en este proyecto se debieron a esta causa las cuales estuvieron fuera de las manos del investigador principal.

El marco de referencia que respalda este proyecto fue el adecuado, al poder utilizar una luz UV de una longitud de onda pertinente, desarrollar un biomarcador natural fluorescente en base a los requerimientos de The Oral Cancer Foundation y la implementación de los mismos a través de ensayos clínicos controlados. Se deben considerar las recomendaciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud, y los organismos estatales y nacionales de salud pública, enfatizando sobre todo en regiones vulnerables, con escasez de servicios médicos, baja asistencia a la consulta médica rutinaria, nula participación en brigadas asistenciales y de salud, y con altos índices de enfermedades no transmisibles, considerados así como los principales factores de riesgo en el desarrollo de lesiones orales potencialmente malignas.

El empleo de fuentes de luz UV de onda corta, tipo portátil como la aquí empleada, resulta una buena opción en la activación de biomarcadores naturales fluorescentes, haciendo hincapié en el aspecto estético que tengan, ya que es un aditamento que es visualizado directamente por el participante al momento de la

aplicación, por lo que debe seguir innovándose su presentación. Por otra parte, procurar el menor tamaño posible puesto que el participante relaciona aditamentos luminosos de menores dimensiones como menos dañinos, y previo a su aplicación mencionar su finalidad e inexistentes efectos dañinos al cuerpo.

Es imprescindible el correcto estudio de la anatomía de las estructuras bucales a examinar previo a la aplicación del biomarcador natural fluorescente en los participantes, mediante ejercicios de simulación o calibración, ya que una falta de asesoramiento en este tema podría conducir a resultados sesgados, puesto que las tonalidades de fluorescencia tienden a ser poco diferenciadas de las demás áreas de la boca en algunos casos. También, debe asegurarse una correcto oscurecimiento del área dónde se aplique el biomarcador natural fluorescente, ya que en gran medida marcaría el éxito o fracaso del mismo.

Establecer Fases delimitadas de estudio siguiendo una metodología precisa aseguró un correcto funcionamiento del biomarcador natural fluorescente. Es indispensable contar con protocolos estrictos validados por Comités de Investigación que proporcionen las observaciones pertinentes previo a la ejecución de los métodos. En este estudio, las aportaciones multi disciplinarias desempeñaron un papel decisivo en la preparación del protocolo de investigación, ejecución de los procedimientos y análisis de resultados.

Se deduce el potencial que puede tener el presente proyecto en una colaboración inter y multidisciplinaria donde el personal de enfermería pueda contribuir en el cuidado del usuario hacia una conducta promotora de salud y sexualidad responsable, odontología en la inspección de tejidos orales, ciencias biológicas en el mejoramiento biotecnológico de los futuros biomarcadores fluorescentes orales, ciencias sociales para identificación , canalización y acompañamiento de casos y demás ciencias. Esto, dejando de lado la idea que salud compete solo a las ciencias médicas y se confirma el

hecho que todos los profesionales pueden contribuir en beneficio de la población y en la disminución de los índices de lesiones orales potencialmente malignas

### **Recomendaciones**

De manera general, se sugiere seguir realizando estudios enfocados en los métodos de detección de lesiones orales potencialmente malignas mediante instrumentos que puedan proporcionar una detección rápida, fácil, no invasiva y predictiva del cáncer oral. En este sentido, y ante la evidencia de resultados prometedores, se recomienda el seguir implementando del biomarcador natural fluorescente y luz UV aquí propuesta para continuar con las Fases III y IV en la investigación de pruebas diagnósticas.

Por otro lado, continuando con la propuesta de innovación en métodos de detección de lesiones orales potencialmente malignas, se sugiere a los investigadores en esta área del conocimiento, probar con las demás variantes de la raíz aquí empleada, indagar en su costo beneficio, poder de detección, sensibilidad y especificidad. Resulta imprescindible seguir realizando proyectos de carácter inter y multi disciplinario, de tal manera que diversas áreas de la ciencia puedan converger y apoyar. En este sentido, es recomendable reunir expertos de otras áreas para tener un mayor panorama de lo que se investiga.

Sería importante seguir implementando la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV en muestras más grandes, considerando contar con todo el material requerido y un excedente previo, instruir y calibrar más personas de apoyo, documentar los casos con cámara digital profesional, y si es posible, cámara intraoral. Con los resultados aquí obtenidos, se podría fomentar la educación para la salud enfocada en promover la alfabetización frente a las lesiones orales potencialmente malignas, con especial atención en las variables que demostraron tener mayor influencia sobre ésta, y con esto apoyar a la reducción neoplasias derivadas en población abierta.

La metodología utilizada fue la apropiada para el tipo de estudio y variables que se midieron, permitiendo alcanzar a la población estimada y lograr los objetivos.

Asimismo, la aplicación de los instrumentos por entrevista permitió evaluar de forma adecuada las variables de interés, sin embargo, en el análisis de resultados surgieron nuevas variables de interés, por lo que se propone reformular los instrumentos para poder obtener la mayor información posible que aporte en beneficio de la ciencia.

En la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV, resulta altamente recomendable el promocionar el procedimiento como un proceso indoloro, breve y que contará con insumos de higiene oral como obsequios para aumentar la participación. La consejería debe ser lo más breve posible y apoyada de ilustraciones si es posible. Dentro del área designada para la realización del procedimiento debe estar el menor número de personas posibles.

Por otra parte, se recomienda realizar un estudio de investigación de pruebas diagnósticas de Fase IIb, dónde se contraste los participantes de sexo femenino que haya resultado positivo a la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV y posterior confirmación por PCR en una prueba de papanicolaou, ya que como se ha documentado, existe alta concordancia de VPH oral-genital, y de esa manera seguir comprobando la sensibilidad y especificidad del método propuesto.

Aunado a lo anterior, se recomienda realizar raspado oral y posterior confirmación por PCR en participantes sin presencia de fluorescencia a la aplicación del biomarcador natural fluorescente y luz UV, esto para confirmar los casos verdaderos negativos e identificar el sesgo existente, así como aplicar el biomarcador natural fluorescente y luz UV a participantes con lesiones orales potencialmente malignas previamente diagnosticadas y cáncer, para identificar casos verdaderos positivos.

## Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System*. Elsevier Health Sciences.
- Adams, S. O., Akano, R. O., & Rauf, R. I. (2020). An evaluation of the chemical composition of soft drinks in Nigeria: a principal component analysis approach. *Advances in Modelling and Analysis*, 57 (1-4), 14-21.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201600099>
- Antonsson, A., de Souza, M., Wood, Z. C., et al. (2021). Natural history of oral HPV infection: Longitudinal analyses in prospective cohorts from Australia. *International Journal of Cancer*, 2 (148), 1964-1972.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.33442>
- Arsene, M. M. J., Viktorovna, P. I., & Davares, A. K. L. (2021). *Galleria mellonella* as a novel eco-friendly in vivo approach for the assessment of the toxicity of medicinal plants. *Journal of Chemical Ecology*, 40 (4), 387–395.  
<https://doi.org/10.1007/s10886-014-0410-8>
- Auguste, A., Deloumeaux, J., Joachim, C., et al. (2020). Joint effect of tobacco, alcohol, and oral HPV infection on head and neck cancer risk in the French West Indies. *Canadian Medical Education Journal*, 9 (18), 6854-6863.  
<https://doi.org/10.1002/cam4.3327>
- Aziz, S. B., Hassan, A. Q., Mohammed, S. J., Karim, W. O., Kadir, M., A Tajuddin, H., & Chan, N. (2019). Structural and optical characteristics of PVA: C-Dot composites: Tuning the absorption of ultraviolet (UV) region. *Nanomaterials*, 9 (2) 216. <https://doi.org/10.3390/nano9020216>
- Barraza, P., & Ozbun, M. (2012). EGFR-MAPK pathway activation in human papillomavirus infected cells. *Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society*. 243 (1), 12-20.



- Bausch, D., Mino-Kenudson, M., Fernández-Del Castillo, C., Warshaw, AL., Kelly, KA., Thayer, SP. (2009). Plectin-1 is a biomarker of malignant pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 13 (11), 48-54. <https://doi.org/10.1158/1078-0432>
- Bologna-Molina, R. E., Castañeda-Castaneira, R. E., Molina-Frechero, N., & Pérez-Rodríguez, E. (2006). Virus del Papiloma Humano y su asociación con cáncer bucal. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 44 (2), 147-154.
- Bustamante-Ramos, G. M., Martínez-Sánchez, A., Tenahua-Quitl, I., Jiménez, C., & López-Mendoza, Y. (2015). Conocimiento y prácticas de prevención sobre el Virus del Papiloma Humano (VPH) en universitarios de la Sierra Sur, Oaxaca. *Anales de la Facultad de Medicina*, 76 (4), 369-376. <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v76i4.11406>
- Cânjău, S., Todea, D., C., M., Sinescu, C., Pricop, M.,O., & Duma, V., F. (2018) Fluorescence influence on screening decisions for oral malignant lesions. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59 (1), 203-209.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos. (15 de Octubre 2017). *Salud familiar y diabetes*. <https://www.cdc.gov/features/family-history-diabetes/index.html>
- Chai, R. C., Lambie, D., Verma, M., & Punyadeera, C. (2015). Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. *Cancer Medicine*, 4 (4), 596-607.
- Cháirez, P., Vega, M. E., Zambrano, G., García, A. G., Maya, I. A., & Cuevas González, J. C. (2015). Presencia del Virus Papiloma Humano en la cavidad oral: Revisión y actualización de la literatura. *International Journal of Odontostomatology*, 9 (2), 233-238. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2015000200009>
- Chaitanya, N. C., Allam, N. S. J., Babu, D. G., Waghay, S., Badam, R. K., & Lavanya, R. (2016). Systematic meta-analysis on association of Human Papilloma Virus

and oral cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12 (2), 969. DOI: 10.4103/0973-1482.179098

Chaturvedi, A. K., Graubard, B. I., Broutian, T., Pickard, R. K. L., Tong, Z. Y., Xiao, W., Kahle, L. & Gillison, M. L. (2015). Findings: association of sexual behaviors with higher prevalence of oral oncogenic Human Papillomavirus infections in U.S. men. *Cancer Research*, 75 (12), 2468-77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2843>

Chen, H., Zhang, Z. Q., Zhao, B., Ning, W. L., Wang, X. Y., & Zhou, F. (2017). Clinical significance of ALDH1 combined with DAPI expression in patients with esophageal carcinoma. *Oncology letters*, 14 (4), 4878-4882. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6743>

Chiu, W., Verschueren, L., van den Eynde, C., Buyck, C., De Meyer, S., ... & Van Damme, E. (2022). Development and optimisation of a high-throughput screening assay for in vitro anti-SARS-CoV-2 activity: evaluation of 5676 phase 1 passed structures. *Journal of Medical Virology*, 4 (7), 3101-3111.

Cicciù, M., Cervino, G., Fiorillo, L., D'Amico, C., Oteri, G., Troiano, G., ... & Laino, L. (2019). Early diagnosis on oral and potentially oral malignant lesions: a systematic review on the VELscope® fluorescence method. *Dentistry Journal*, 7 (3), 93. <https://doi.org/10.3390/dj7030093>

Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers.

Daly, M. J., Fleisig, J., Chan, H., Ferrari, M., Douglas, C., Wilson, B. C., ... & Irish, J. C. (2020). Image-guided fluorescence tomography in tissue phantom models of oral cancer. *Molecular-Guided Surgery*, 1 (11222), 112220. <https://doi.org/10.1117/12.2547348>

- Dang, J., Feng, Q., Eaton, K. D., Jang, H., & Kiviat, N. B. (2015). Detection of HPV in oral rinse samples from OPSCC and non-OPSCC patients. *BMC Oral Health*, 15 (1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0111-x>
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2017). *Roitt's essential immunology*. John Wiley & Sons.
- Demchenko, A. P., Mély, Y., Duportail, G., & Klymchenko, A. S. (2009). Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 96 (9), 3461-3470. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.012>
- Demopoulos, C. A. (25 de marzo de 2018). *Promoting the HPV Vaccine: An Opportunity For Medical-Dental Collaboration*. Recuperado el 18 de septiembre de 2019 de <https://commons.gc.cuny.edu/docs/2018-winter-hppa-516-public-health-promoting-the-hpv-vaccine-uptake-in-african-american-community/>
- Dobri, S. C. D., Moslehi, A. H., & Davies, T. C. (2019). Are oral fluid testing devices effective for the roadside detection of recent cannabis use? A systematic review. *Public health*, 171 (1), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2019.03.006>
- Donà, M. G., Rollo, F., Pichi, B., Spriano, G., Pellini, R., Covello, R., ... & Benevolo, M. (2017). Evaluation of the Xpert<sup>®</sup> HPV assay in the detection of Human Papillomavirus in formalin-fixed paraffin-embedded oropharyngeal carcinomas. *Oral Oncology*, 72 (1), 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.07.016>
- Drop, B., Strycharz-Dudziak, M., Kliszczewska, E., & Polz-Dacewicz, M. (2017). Coinfection with Epstein–barr Virus (EBV), Human Papilloma Virus (HPV) and Polyoma BK Virus (BKPyV) in laryngeal, oropharyngeal and oral cavity cancer. *International journal of molecular sciences*, 18 (12), 2752. <https://doi.org/10.3390/ijms18122752>

- D'Souza, G., Wentz, A., Kluz, N., Zhang, Y., Sugar, E., Youngfellow, R. M., ... & Gillison, M. L. (2016). Sex differences in risk factors and natural history of oral Human Papillomavirus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 213 (12), 1893-1896. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw063>
- Duanes, Y. M. (2018). Intervenciones de enfermería en pacientes con cirugía ambulatoria de enfermedades anorectales. *Revista Cubana de Enfermería*, 34 (1), 247-261.
- Durham, J. S., Brasher, P., Anderson, D., W., et al. (2020). Effect of Fluorescence Visualization-Guided Surgery on Local Recurrence of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, (146) 12, 1149–1155. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2020.3147>
- Etikan, I., Musa, S. A., & Alkassim, R. S. (2016). Comparison of convenience sampling and purposive sampling. *American Journal of Theoretical and Applied Statistics*, 5 (1), 1-4. <https://doi.org/10.11648/j.ajtas.20160501.11>
- García, R. C., & Martínez, L. F. L. (2018). Mejora de la resolución espectral de un monocromador usando un controlador de micropasos. *Pistas Educativas*, 36 (112), 998-1019.
- Geisler, J., Touma, J., Rahbar, A., Söderberg-Nauclér, C., & Vetvik, K. (2019). A Review of the Potential Role of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infections in Breast Cancer Carcinogenesis and Abnormal Immunity. *Cancers*, 11(12), 1842. <https://doi.org/10.3390/cancers11121842>
- Giguère, C., Lagacé, J., Ellaham, N. N., Pichora-Fuller, M. K., Goy, H., Bégin, C., ... & Bowman, R. (2020). Development of the Canadian digit triplet test in English and French. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 147 (3), 252-258.
- Gipson, B. J., Robbins, H. A., Fakhry, C., & D'Souza, G. (2018). Sensitivity and specificity of oral HPV detection for HPV-positive head and neck cancer. *Oral oncology*, 77 (1), 52-56.

- Gluud, C., & Gluud, L. L. (2005). Evidence based diagnostics. *BMJ Clinical research*, 330 (7493), 724–726. <https://doi.org/10.1136/bmj.330.7493.724>
- Gramotnev, D. K., & Bozhevolnyi, S. I. (2014). Nanofocusing of electromagnetic radiation. *Nature Photonics*, 8(1), 13. <https://doi.org/10.1038/NPHOTON.2013.232>
- Gray, J. R., Grove, S. K., & Sutherland, S. (2017). *Burns and Grove's The Practice of Nursing Research: Appraisal, Synthesis, and Generation of Evidence*. Edition, Elsevier, St. Louis.
- Grove S. (2013). *The Practice of Nursing Research: Appraisal, Synthesis, and Generation of Evidence*. Elsevier Health Sciences.
- Gurung, P., & De, P. (2017). Spectrum of biological properties of Cinchona alkaloids: A brief review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6 (4), 162-166.
- Gutierrez-Herrera, E., Ortiz, A. E., Doukas, A., & Franco, W. (2016). Fluorescence excitation photography of epidermal cellular proliferation. *British Journal of Dermatology*, 174 (5), 1086-1091. <https://doi.org/10.1111/bjd.14400>
- Hasibuan, Y. A., Ratnadewi, D., & Mas'ud, Z. A. (2021). Alkaloids Production and Cell Growth of Cinchona ledgeriana Moens: Effects of Fungal Filtrate and Methyl Jasmonate Elicitors. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 6 (1), 31-40. <https://doi.org/10.17509/IJOST.V6I1.31479>
- Hema Shree, K., Ramani, P., Sherlin, H., Sukumaran, G., Jeyaraj, G., Don, K. R., ... & Sundar, R. (2019). Saliva as a diagnostic tool in oral squamous cell carcinoma—a systematic review with meta analysis. *Pathology & Oncology Research*, 25 (2), 447-453. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00588-2>
- Henry, P. S., Vannucci, G., Willis, T. M., Johnson, S., Bennett, R., Barzegar, F., ... & Barnickel, D. J. (2019). U.S. Patent No. 10,468,739. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Jalali, A., Dabaghian, F., & Zarshenas, M. M. (2021). Alkaloids of *Peganum harmala*: Anticancer biomarkers with promising outcomes. *Current Pharmaceutical Design*, 27 (2), 185-196. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201125103941>
- Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., & Tran, S. D. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6 (1), 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>
- Johnson, S. G., & Joannopoulos, J. D. (2018). *Electromagnetic Theory*. Encyclopedia of Modern Optics.
- Josephson, L. (2018). U.S. Patent Application No. 15/728,502.
- Kala, N., Manjeu, J., Dominic, N., & Babu, S. P. K. K. (2018). Oral pemphigus without skin lesions treated with pulse steroid therapy. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 22 (6), 551. [https://doi.org/10.4103/jisp.jisp\\_345\\_18](https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_345_18)
- Kaur, J., Jacobs, R., Huang, Y., Salvo, N., & Politis, C. (2018). Salivary biomarkers for oral cancer and pre-cancer screening: a review. *Clinical Oral Investigations*, 22 (2), 633-640. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2337-x>
- Kennedy, R. A. (2016). HPV for the oral surgeon. *Oral Surgery*, 9 (1), 4-9. <https://doi.org/10.1111/ors.12152>
- Kepka, D., Rutkoski, H., Pappas, L., Tay, D. L., Winkler, J. R., Dixon, B., ... & Pinzon, L. M. (2019). US oral health students' willingness to train and administer the HPV vaccine in dental practices. *Preventive Medicine Reports*, 15 (1), 100957. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2019.100957>
- Lane, P.M., Gilhuly, T., Whitehead, P., Zeng, H., Poh, C.F.,..... Williams, P.M. (2006). Simple device for the direct visualization of oral-cavity tissue fluorescence. *Journal of Biomedical Optics*, 11 (2), 024006. <https://doi.org/10.1117/1.2193157>
- Li, K., Hu, X. X., Liu, H. W., Xu, S., Huan, S. Y., Li, J. B., ... & Zhang, X. B. (2018). In Situ Imaging of Furin Activity with a Highly Stable Probe by Releasing of

Precipitating Fluorochrome. *Analytical Chemistry*, 90 (19), 11680-11687.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03335>

- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2018). Graphene nanomaterials: Synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (11), 3564. <https://doi.org/10.3390/ijms19113564>
- Lin, Y. T., Darvishi, S., Preet, A., Huang, T. Y., Lin, S. H., Girault, H. H., ... & Lin, T. E. (2020). A review: electrochemical biomarcadors for oral cancer. *Chemosensors*, 8 (3), 54. <https://dx.doi.org/10.3390/chemosensors8030054>
- Liuzzi, J., Rincón, N., Velázquez, Y., & Leañez, L. (2009). Tumor de cavidad oral como primera manifestación de un adenocarcinoma gástrico metastásico. *Revista Venezolana de Oncología*, 21 (3), 157-164.
- Louie, K., Ashdown-Barr, L., Reuter, C., Lorincz, A., Sasieni, P., & Zelin, J. (2015). P235 Prevalence and risk factors associated with oral HPV among sti clinic attendees. *Sexually Transmitted Diseases*, 91 (1), 9393. <http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2015-052126.277>
- Louvanto, K., Sarkola, M., Rintala, M., Syrjänen, K., Grenman, S., & Syrjänen, S. (2017). Breast milk is a potential vehicle for human papillomavirus transmission to oral mucosa of the spouse. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36 (7), 627-630. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001546>
- MacGregor, M., Shirazi, H. S., Chan, K. M., Ostrikov, K., McNicholas, K., Jay, A., ... & Vasilev, K. (2021). Cancer cell detection device for the diagnosis of bladder cancer from urine. *Biomarcadors and Bioelectronics*, 171 (1), 112699. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112699>
- Maguiña, M. D., & Valencia, Y. V. (2018). *Factores que limitan la realización del examen de papanicolaou en usuarias del puesto de salud de Vicos, Carhuaz*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo"]. <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/2840>

- Maxwell, J. C. (1865). VIII. A dynamical theory of the electromagnetic field.  
*Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 14 (155), 459-512.
- Mello, F. W., Miguel, A. F. P., Dutra, K. L., Porporatti, A. L., Warnakulasuriya, S., Guerra, E. N. S., & Rivero, E. R. C. (2018). Prevalence of oral potentially malignant disorders: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 47 (7), 633-640. <https://doi.org/10.1111/jop.12726>
- Mikkonen, J. J. W., Singh, S. P., Herrala, M., Lappalainen, R., Myllymaa, S., & Kullaa, A. M. (2016). Salivary metabolomics in the diagnosis of oral cancer and periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, 51 (4), 431-437. <https://doi.org/10.1111/jre.12327>
- Mineta, H., Ogino, T., Amano, H. M., Ohkawa, Y., Araki, K., Takebayashi, S., & Miura, K. (1998). Human Papilloma Virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, 18 (6), 4765-4768.
- Morikawa, T., Shibahara, T., Nomura, T., et al. (2020). Non-invasive early detection of oral cancers using fluorescence visualization with optical instruments. *Cancers*, 12 (1), 2771. <https://doi.org/10.3390/cancers12102771>
- Negin, E., Jarollahi, F., Barootiyan, S., Seyyedi, F., Jalaie, S., & Katz, J. (2019). Development, validity, reliability and normative data of the Persian Phonemic Synthesis Test (P-PST). *International Journal of Audiology*, 59 (3), 230-235. doi: 10.1080/14992027.2019.1688401.
- Nikolovski, B., Radojkova, VN., Dimova, C., et al. (2021). Tissue fluorescence imaging for quick non-invasive diagnosis in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Morphological Sciences*, 4 (3), 1-13
- Obiri-Yeboah, D., Adu-Sarkodie, Y., Djigma, F., Akakpo, K., Aniakwa-Bonsu, E., Amoako-Sakyi, D., & Mayaud, P. (2017). Options in Human Papillomavirus (HPV) detection for cervical cancer screening: comparison between full genotyping and a rapid qualitative HPV-DNA assay in Ghana. *Gynecologic*



*Oncology Research and Practice*, 4 (1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40661-017-0041-1>

Olaza, A. F., Rosas, N. N., Olaza, V. A., & De la Cruz Ramírez, Y. M. (2018). Barriers to the non-acceptance of cervical cancer screenings (pap smear test) in women of childbearing age in a rural area of Peru. *Ecancermedicalscience*, 31 (13), 901. <https://doi.org/10.3332%2Fecancer.2019.901>

Organización Mundial de la Salud. (10 de Noviembre de 2020). Encuestas de Salud Bucal Dental. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41997>

Pacheco-Domínguez, R. L., Durazo-Arvizu, R. A., López-Hernández, A., Figueroa-Padilla, J., Ramírez-González, J. B., & López-Cervantes, M. (2019). Seroprevalence of HPV serotypes 6, 11, 16 and 18 in unvaccinated children from Mexico City. *Epidemiology & Infection*, 147 (1), 201. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001341>

Pampena, R., La Viola, G., & Annetta, A. (2019). *Diagnosing the Less Common Skin Tumors: Clinical Appearance and Dermoscopy*. Caterina Longo.

Park, C. K., Kim, Y. H., Hwangbo, S., & Cho, H. (2017). Photodynamic therapy by conjugation of cell-penetrating peptide with fluorochrome. *International Journal of Nanomedicine*, 12 (1), 8185-8196. <https://dx.doi.org/10.2147/IJN.S148332>

Pavlova, I., Weber, C., Schwarz, R., Williams, M., Gillenwater, A., Kortum, R. (2009). Fluorescence Spectroscopy of Oral Tissue: Monte Carlo Modeling with Site-Specific Tissue Properties. *Journal of Biomedical Optics*, 14 (1), 014009. <https://doi.org/10.1117%2F1.3065544>

Peixoto, A. P., Campos, G. S., Queiroz, L. B., & Sardi, S. I. (2011). Asymptomatic oral Human Papillomavirus (HPV) infection in women with a histopathologic diagnosis of genital HPV. *Journal of Oral Science*, 53 (4), 451-459. <https://doi.org/10.2334/JOSNUSD.53.451>

- Rindal, D. B., Gilbert, G., Carcelén, C., Funkhouser, E., Durand, E., Uppgaard, D. A., ... & Gordan, V. V. (2019). Feasibility and acceptance of oral Human Papillomavirus detection in the dental office: Results from The National Dental Practice-Based Research Network. *The Journal of the American Dental Association*, 150 (2), 130-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.adaj.2018.10.022>
- Roca Brito, A. J., Rojas Ramírez, C. B., Chacón Narváez, É. E., Guillén Silva, Y. A., & López López, L. C. (2018). Diagnósticos y tratamientos de la infección por VPH en cavidad bucal. *Revista Venezolana de Investigación*, 7 (2), 150-179.
- Sacco, A. G., & Cohen, E. E. (2017). Serum antibodies open the door to prediction and prognostication in Human Papillomavirus–related head and neck cancer. *Cancer*, 123 (22), 4310-4313. <https://doi.org/10.1002/cncr.30970>
- Saccomano, S. C., Jewell, M. P., & Cash, K. J. (2021). A Review of chemosensors and biomarcadors for monitoring biofilm dynamics. *Cancer*, 123 (22), 4310-4313. <https://doi.org/10.1002/cncr.30970>
- Sahl, S. J., Hell, S. W., & Jakobs, S. (2017). Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18 (11), 685. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.71>
- Saksø, M., Jensen, K., Andersen, M., Hansen, C. R., Eriksen, J. G., & Overgaard, J. (2020). DAHANCA 28: A phase I/II feasibility study of hyperfractionated, accelerated radiotherapy with concomitant cisplatin and nimorazole (HART-CN) for patients with locally advanced, HPV/p16-negative squamous cell carcinoma of the oropharynx, hypopharynx, larynx and oral cavity. *Radiotherapy and Oncology*, 148 (2), 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.03.025>
- Sánchez Santillán, T., Silva Valqui, G., Chichipe Puscan, A. K., Trigos Pinedo, M., Bobadilla Rivera, L. G., & Jiménez Yoplac, G. Y. (2020). Influencia de sustratos y concentraciones de ácido indol butírico en la propagación vegetativa de

- Cinchona officinalis L.(quina) en Amazonas, Perú. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8 (2), 241-251. <https://doi.org/10.46925/%2FRDLUZ.32.19>
- Sánchez-Vargas, L. O., Díaz-Hernández, C., & Martínez-Martínez, A. (2010). Detection of Human Papilloma Virus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices. *Infectious Agents and Cancer*, 5 (1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-5-25>
- Secretaría de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT)*. Instituto Nacional de Salud Pública. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ensanut/2018/doc/ensanut\\_2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ensanut/2018/doc/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf)
- Simonato, L. E., Tomo, S., Navarro, R. S., & Villaverde, A. G. J. B. (2019). Fluorescence visualization improves the detection of oral, potentially malignant, disorders in population screening. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 27, 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.017>
- Slama, J., Sehnal, B., Dusek, L., Zima, T., & Cibula, D. (2015). Impact of factors on prevalence of anal HPV infection in women with simultaneous cervical lesion. *Neoplasma*, 62 (2), 308-314. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2015\\_037](https://doi.org/10.4149/neo_2015_037)
- Smith, J. D., Shuman, A. G., & Riba, M. B. (2017). Psychosocial issues in patients with head and neck cancer: an updated review with a focus on clinical interventions. *Current Psychiatry Reports*, 19 (9), 56. <https://doi.org/10.1007/s11920-017-0811-9>
- Smith, R., Dalke, D., Al-Ali, A., Diab, M., & Lamego, M. (2019). Multiple wavelength sensor emitters (U.S. Patent No. 10,327,683). U.S. Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US10327683B2/en>
- Soto, C. (2011). *Incidencia de los procesos de divulgación en los medios impresos locales sobre el contagio del Virus Del Papiloma Humano (VPH), en el género*

*femenino mayor de veinte años residentes en la ciudad de Loja, Segundo Semestre Del Año 2010. Propuesta Alternativa.* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Loja]. <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/3125>

Strieth-Kalthoff, F., James, M. J., Teders, M., Pitzer, L., & Glorius, F. (2018). Energy transfer catalysis mediated by visible light: principles, applications, directions. *Chemical Society Reviews*, 47 (19), 7190-7202.

<https://doi.org/10.1039/c8cs00054a>

Tatehara, S., & Satomura, K. (2020). Non-Invasive Diagnostic System Based on Light for Detecting Early-Stage Oral Cancer and High-Risk Precancerous Lesions—Potential for Dentistry. *Cancers*, 12 (11), 3185.

<http://dx.doi.org/10.3390/cancers12113185>

Tatehara, S., & Satomura, K. (2020). Non-Invasive Diagnostic System Based on Light for Detecting Early-Stage Oral Cancer and High-Risk Precancerous Lesions—Potential for Dentistry. *Cancers*, 12 (11), 3185.

<http://dx.doi.org/10.3390/cancers12113185>

The Oral Cancer Foundation. (2 de Octubre de 2019). *OCF's opinions about HPV and oral cancer.* <https://oralcancerfoundation.org/understanding/hpv/ocfs-opinions-hpv-oral-cancer/>

Tipirneni, K. E., Rosenthal, E. L., Moore, L. S., Haskins, A. D., Udayakumar, N., Jani, A. H., ... & Warram, J. M. (2017). Fluorescence imaging for cancer screening and surveillance. *Molecular Imaging and Biology*, 19 (5), 645-655.

<https://doi.org/10.1007/s11307-017-1050-5>

Tiwari, S., Gupta, P. K., Bagbi, Y., Sarkar, T., & Solanki, P. R. (2017). L-cysteine capped lanthanum hydroxide nanostructures for non-invasive detection of oral cancer biomarker. *Biomarcadors and Bioelectronics*, 89 (2), 1042-1052.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.020>

- Tomo, S., Miyahara, G. I., & Simonato, L. E. (2019). History and future perspectives for the use of fluorescence visualization to detect oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 28 (2), 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.10.005>
- Tsao, A. S., Papadimitrakopoulou, V., Lin, H., Guo, M., Lee, J. J., Holsinger, F. C., ... & Sturgis, E. M. (2016). Concordance of oral HPV prevalence between patients with oropharyngeal cancer and their partners. *Infectious Agents and Cancer*, 11 (1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13027-016-0066-9>
- Venegas-Reyes, C., Hernández, D., González, M., & Lorenzo, C. J. (2011). Infección por Virus del Papiloma Humano: asociación entre infección genital y bucal. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 71 (3), 164-173.
- Venkataramana, S., & Shankapal, P. (2020). Development and Validation of an Innovative Hand-Held Device for Early Detection of Oral Cancer and Oral Potentially Malignant Disorders. *Emerging Trends in Photonics, Signal Processing and Communication Engineering*, 14 (2), 203-210. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3477-5\\_26](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3477-5_26)
- Visalli, G., Currò, M., Facciola, A., Riso, R., Mondello, P., Laganà, P., ... & Spataro, P. (2016). Prevalence of Human Papillomavirus in saliva of women with HPV genital lesions. *Infectious Agents and Cancer*, 11 (1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13027-016-0096-3>
- Vranic, S., Cyprian, F. S., Akhtar, S., & Al Moustafa, A. E. (2018). The role of epstein–barr virus in cervical cancer: a brief update. *Frontiers in Oncology*, 8 (1), 113. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00113>
- Wang, J., Yu, J., Wang, T., Li, C., Wei, Y., Deng, X., & Chen, X. (2020). Emerging intraoral biomarcadors. *Journal of Materials Chemistry*, 8 (16), 3341-3356. <https://doi.org/10.1039/C9TB02352F>

- Wang, R., & Wang, Y. (2021). Fourier transform infrared spectroscopy in oral cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 1 (22), 1206.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22031206>
- Wang, S., Shuai, Y., Sun, C., Xue, B., Hou, Y., Su, X., Sun, Y. Lighting Up Live Cells with Smart Genetically Encoded Fluorescence Probes from GMars Family. *ACS Sensors*, 26 (11), 2269-2277. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00449>
- Warnakulasuriya, S. (2018). Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 125(6), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.011>
- Winer, R. L., Gheit, T., Feng, Q., Stern, J. E., Lin, J., Cherne, S., & Tommasino, M. (2019). Prevalence and Correlates of  $\beta$ - and  $\gamma$ -Human Papillomavirus Detection in Oral Samples From Mid-Adult Women. *The Journal of Infectious Diseases*, 219 (7), 1067-1075. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2017.11.002>
- Wood, Z. C., Bain, C. J., Smith, D. D., Whiteman, D. C., & Antonsson, A. (2017). Oral Human Papillomavirus infection incidence and clearance: a systematic review of the literature. *Journal of General Virology*, 98 (4), 519-526.  
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000727>
- World Health Organization (21 de Enero de 2020). *Promoting access to medical technologies and innovation: Intersections between public health, intellectual property and trade*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241504874>
- Young, D., Xiao, C. C., Murphy, B., Moore, M., Fakhry, C., & Day, T. A. (2015). Increase in head and neck cancer in younger patients due to Human Papillomavirus (HPV). *Oral Oncology*, 51 (8), 727-730.  
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.03.015>
- Zhou, L., Fan, Y., Wang, R., Li, X., Fan, L., & Zhang, F. (2019). High-Capacity Upconversion Wavelength and Lifetime Binary Encoding for Multiplexed

Biodetection. *Angewandte Chemie*, 130 (39), 13006-13011.

<https://doi.org/10.1002/ange.201808209>

Zou, Y., Zhang, Y., Hu, Y., & Gu, H. (2018). Ultraviolet detectors based on wide bandgap semiconductor nanowire: A review. *Sensors*, 18 (7), 2072.

<https://doi.org/10.3390/s18072072>

## **Apéndices**



## Apéndice A

### Consentimiento Informado



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### FACULTAD DE ENFERMERÍA

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título de proyecto:** Evaluación de Biomarcador Natural Fluorescente para Tamizaje de Lesiones Orales Potencialmente Malignas en Población Abierta

**Autores/Estudiantes:** MCSP. Guillermo Cano Verdugo

**Director de Tesis/Asesor:** Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez

#### **Introducción/Objetivo del Estudio:**

Estamos interesados en probar una solución con propiedades fluorescentes activada con una lámpara con luz UV para facilitar la identificación de lesiones malignas en cavidad oral, las cuales son laceraciones que pueden encontrarse en boca por hábitos como fumar, beber alcohol o causas desconocidas y pueden derivar en formaciones tumorales si no son detectadas a tiempo, por lo cual te invitamos a participar en este estudio. Tu participación consistirá en aplicarte una breve encuesta, y posteriormente la solución en forma de spray en el interior de la boca, posteriormente se utilizará una lámpara con luz UV para iluminar la boca y se tomará una fotografía del interior de tu boca. Podrás realizar el procedimiento sin interferir tu trabajo en la Facultad. El propósito de este proyecto es probar un biomarcador natural fluorescente que al tener contacto con una luz UV, pueda detectar presuntivamente lesiones orales potencialmente malignas. Lo anterior es con el objetivo de obtener información científica para un proyecto de Tesis y obtener el grado de Doctor en Ciencias de Enfermería. A continuación, se te explicará el procedimiento que te ayudará a decidir si deseas participar.

#### **Descripción del Estudio/Procedimientos:**

Se les informa que ustedes han sido elegidos al azar para participar en este estudio, será un grupo de aproximadamente 250 participantes los cuales necesitamos para cumplir con el objetivo. Tu participación en la realización del procedimiento será en un solo momento y demorará un máximo de 10 minutos.

La Facultad en la cual laboras autorizó la aplicación de este estudio, si deseas participar te pido de la manera más atenta que firmes este consentimiento informado. El procedimiento se realizará tomando en cuenta los siguientes puntos:

- Se contará con un área asignada por la Facultad donde se asegure la confidencialidad y tranquilidad para realizar el procedimiento.
- Se te dará una breve orientación respecto al procedimiento que se llevará a cabo.
- Posteriormente, se te aplicará una encuesta que constará de preguntas acerca de tu edad, estado civil y ocupación. Pueden tomarse notas adicionales durante la encuesta. Aunque se cuenta con unas preguntas previamente establecidas te puedes sentir con la libertad de preguntar lo que gustes.

- Posteriormente, el personal profesional de salud te pedirá abras tu boca y te aplicará dos atomizaciones del biomarcador natural fluorescente en forma de spray en el interior de tu boca, dirigirá una luz UV al interior de tu boca sin tocar la superficie por espacio de 3 segundos, y te comunicará el resultado que obtuviste. Cabe resaltar que este resultado es de carácter presuntivo, lo cual nos habla de posibles lesiones que en caso de ser positivas, requerirán confirmación diagnóstica. Por último, podrían tomarte una fotografía del interior de tu boca donde no saldría tu cara, te darán orientación posterior al procedimiento y agradeceremos tu participación.
- Probablemente serás seleccionado aleatoriamente para realizarte un hisopado (toma de saliva con un hisopo), para corroborar la detección ante la aplicación del biomarcador natural fluorescente. Dicho procedimiento sería realizado por expertos en patología oral, y no tendría costo para ti.
- En caso de obtener un resultado presuntivo positivo, se te dará orientación al respecto y se te referirá con el especialista en patología oral, cuyos costos correrán por tu cuenta.
- Por último, el investigador principal podría contactarte vía telefónica posterior a la realización del procedimiento para preguntarte en qué estado se encuentra el sitio donde fue aplicada del biomarcador natural fluorescente.

La información que proporcionas será anónima, los resultados pueden ser publicados en revistas científicas, pero se realizará de manera grupal. Ni tu nombre, ni datos de identificación aparecerán en estos. Aun firmando este consentimiento, podrás retirarte en el momento que lo desees.

#### **Riesgos o molestias y aspectos experimentales del estudio:**

Los riesgos potenciales que implican tu participación en este estudio son nulos ya que del biomarcador natural fluorescente es elaborado a partir de productos naturales (raíz de quina), se encuentra esterilizada y previamente probada en experimentos *in vitro* de laboratorio con resultados favorecedores, sin embargo, si te sientes incómodo con alguna pregunta o en algún momento del procedimiento puedes retirar tu participación de este estudio y esto no tendrá repercusiones de ningún tipo.

#### **Beneficios esperados:**

Como principal resultado podrás confirmar tu estado de salud oral, y en un futuro con los resultados que arroje esta investigación, se podría tener un método de detección de lesiones orales potencialmente malignas y con ello poder disminuir las consecuencias relacionadas a las mismas, principalmente cáncer oral.

#### **Compromisos del Investigador:**

Cualquier duda que surja al leer este consentimiento o durante tu participación será aclarada en el momento que la hagas saber. Tienes la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los riesgos y beneficios, y otros asuntos relacionados con el estudio. Por lo anteriormente mencionado, cualquier duda que surja puede contactar al presidente del Comité de Ética en Investigación, de la Facultad de Enfermería de la UANL, comunicándote al tel. 81 8348 1010 en Av. Gonzalitos 1500 Nte. Col. Mitras Centro, Monterrey, N. L. En un horario de 9:00 a

16:00 horas, o si lo prefiere puede escribirle a la siguiente dirección de correo electrónico: [investigación.fae@gmail.com](mailto:investigación.fae@gmail.com)

Nombre: _____	Fecha: _____
Firma: _____	Día / Mes / Año
Testigo 1: _____	Fecha: _____
Dirección: _____	Día / Mes / Año
Testigo 2: _____	Fecha: _____
Dirección: _____	Día / Mes / Año
Nombre de la persona que obtiene el consentimiento:	Fecha: _____
_____	Día / Mes / Año

## Apéndice B

### Encuesta Perfil Sociodemográfico y de Salud

A continuación, encontrarás una serie de preguntas en las cuáles deberás especificar la respuesta con la que más te identifiques escribiéndola o encerrándola en un círculo según sea el caso. Las respuestas serán confidenciales y usadas solamente con fines académicos. Celular: \_\_\_\_\_

1) Edad en años cumplidos:

a. \_\_\_\_\_

2) Sexo:

a. \_\_\_\_\_

3) Ocupación:

a. \_\_\_\_\_

4) Estado civil:

a. \_\_\_\_\_

5) ¿Fuma? Si la respuesta es **SI**, pasar a la siguiente pregunta, de lo contrario pasar a la pregunta No. 7:

a. \_\_\_\_\_

6) ¿Fuma al menos un cigarro por semana (electrónico o de tabaco)?

a. \_\_\_\_\_

7) ¿Bebe alcohol? Si la respuesta es **SI**, pasar a la siguiente pregunta, de lo contrario pasar a la pregunta No. 9:

a. \_\_\_\_\_

8) ¿Toma al menos una bebida alcohólica por semana?

a. \_\_\_\_\_

9) ¿Ha sido diagnosticado de alguna enfermedad por un médico? Si la respuesta es **SI**, pasar a la siguiente pregunta, de lo contrario pasar a la pregunta No. 11:

a. \_\_\_\_\_

10) En caso afirmativo: ¿Cuál sería?

b. \_\_\_\_\_

4) ¿Existen casos confirmados de cáncer en su familia?

a. Si

b. No

11) ¿Cómo consideras tu salud oral?

c. Buena

d. Regular

e. Mala

12) ¿Cuentas con heridas en la boca de más de dos semanas de duración que no hayan sanado?

a. \_\_\_\_\_

## Apéndice C

### Lista de Verificación del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV

Folio del participante: \_\_\_\_\_

1. Resultado:
  - i. Presuntivo positivo para lesiones malignas en cavidad oral
  - ii. Presuntivo negativo para lesiones malignas en cavidad oral
2. Hallazgos: \_\_\_\_\_
3. Existe necesidad de confirmar el diagnóstico:
  - i. Si
  - ii. No
4. Existe necesidad de remitir para su posterior atención a patología oral:
  - i. Si
  - ii. No

## Apéndice D

### Oficios para Solicitud de Realización de la Fase II: Validación Discriminatoria del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV (*in vivo*)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

FAEN



DFE-0580/2021

**DRA. MARÍA TERESA LEDEZMA ELIZONDO**

Directora de la Facultad de Arquitectura  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
P r e s e n t e.

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico [guillermocano\\_verdugo@hotmail.com](mailto:guillermocano_verdugo@hotmail.com) y teléfono celular mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.



Atentamente,  
"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021



DIRECCIÓN

**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVAIS**  
Directora

Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460  
Monterrey, Nuevo León, México  
Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección



FAEN

DFE-0585/2021

**MTR. OSCAR P. LUGO SERRATO**

Director de la Facultad de Derecho y Criminología  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
P r e s e n t e.

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.

FACULTAD DE DERECHO  
Y CRIMINOLOGÍA

03 SEP 2021  
Estefanía 13:30 hrs  
**RECIBIDO**  
SECRETARÍA TÉCNICA

Atentamente,  
"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021

*y m/m*

**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS**  
Directora



DIRECCIÓN

Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460  
Monterrey, Nuevo León, México  
Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107







UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

FAEN



DFE-0586/2021

**DRA. ARGELIA VARGAS MORENO**

Directora de la Facultad de Ciencias Químicas  
 Universidad Autónoma de Nuevo León  
 P r e s e n t e .

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado **"Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral"**, el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

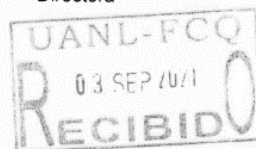
Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico [guillermocano\\_verdugo@hotmail.com](mailto:guillermocano_verdugo@hotmail.com) y teléfono celular , mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.

Atentamente,  
 "Alere Flammas Veritatis"  
 Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021

**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS**  
 Directora



DIRECCIÓN



Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460  
 Monterrey, Nuevo León, México  
 Tel. 83461010 8333 41 90 exts. 104 y 107





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

FAEN



DFE-0579/2021

**DR. JOSÉ IGNACIO GONZÁLEZ ROJAS**

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas  
 Universidad Autónoma de Nuevo León  
 Presente.

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular , mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.

Atentamente,  
 "Alere Flammam Veritatis"  
 Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021



**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS**  
 Directora

DIRECCIÓN





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

FAEN



DFE-0587/2021

**DR. ATILANO MARTÍNEZ HUERTA**

Director de la Facultad de Físico Matemáticas  
 Universidad Autónoma de Nuevo León  
 P r e s e n t e .

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.



Atentamente,  
 "Alere Flammam Veritatis"  
 Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021

DIRECCIÓN DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS  
 Directora



DIRECCIÓN

Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460  
 Monterrey, Nuevo León, México  
 Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107





UANL

FAEN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

DFE-0588/2021

**DR. RICARDO GONZÁLEZ ALCORTA**  
 Director de la Facultad de Ingeniería Civil  
 Universidad Autónoma de Nuevo León  
 P r e s e n t e.

Por este conducto me es grato enviarte un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.

Atentamente,  
 "Alere Flammas Veritatis"  
 Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021



DIRECCIÓN

DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁS



Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460  
 Monterrey, Nuevo León, México  
 Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

FAEN



DFE-0583/2021

**DR. ARNULFO TREVIÑO CUBERO**

Director de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Presente.

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular [redacted] mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.



Atentamente,  
"Alere Flammas Veritatis"  
Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021

**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS**  
Directora



DIRECCIÓN

Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P. 64460  
Monterrey, Nuevo León, México  
Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección



FAEN

DFE-0584/2021

**M.C. LUDIVINA CANTÚ ORTIZ**

Directora de la Facultad de Filosofía y Letras  
 Universidad Autónoma de Nuevo León  
 P r e s e n t e.

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.

Atentamente,  
 "Alere Flammam Veritatis"  
 Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021

**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS**  
 Directora



03 SET. 2021 VISION  
 UANL





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

FAEN



DFE-0581/2021

**MTS. LAURA GONZÁLEZ GARCÍA**

Directora de la Facultad de Trabajo Social y Desarrollo Humano  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Presente.

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.

Atentamente,  
"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021

**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS**  
Directora



DIRECCIÓN



FACULTAD DE TRABAJO SOCIAL  
Y DESARROLLO HUMANO  
DIRECCIÓN

Revisión  
3 Sept 2021  
Francis Ochoa

Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460  
Monterrey, Nuevo León, México  
Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107



EDUCACIÓN DE CALIDAD PARA TRANSFORMAR Y  
TRANSICIÓN EN BENEFICIO DE LA HUMANIDAD



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

FAEN



DFE-0582/2021

**DR. JOSÉ LEANDRO TRISTÁN RODRÍGUEZ**

Director de la Facultad de Organización Deportiva  
 Universidad Autónoma de Nuevo León  
 P r e s e n t e.

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se dará consejería para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular , mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.



Atentamente,  
 "Alere Flammam Veritatis"  
 Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021



DIRECCIÓN

**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS**

Directora

Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460  
 Monterrey, Nuevo León, México  
 Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107







UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Dirección

FAEN



DFE-0578/2021

**DR. LUIS ALBERTO VILLARREAL VILLARREAL**

Director de la Facultad de Contaduría Pública y Administración  
 Universidad Autónoma de Nuevo León  
 Presente.

Por este conducto me es grato enviarle un cordial saludo, así mismo, solicitar a usted su autorización para llevar a cabo la Fase II del proyecto titulado "**Formulación Reveladora Fluorescente y Dispositivo de Emisión Luminiscente para Tamizaje de Lesiones Potencialmente Malignas en Cavidad Oral**", el cual plantea la creación de un enjuague oral que detecta lesiones en boca con potencial maligno, y que es elaborado con raíces de plantas naturales con propiedades fluorescentes al ser expuestas a una lámpara de luz UV de baja intensidad.

Dicho proyecto cuenta con las aprobaciones de los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Enfermería, y ha sido experimentado *in vitro* en laboratorio mostrando resultados prometedores, y es parte del producto final de Tesis del joven **Guillermo Cano Verdugo**, alumno de 5° semestre del programa de Doctorado en Ciencias de Enfermería, quien se encuentra dirigido por la Dra. Dora Julia Onofre Rodríguez.

La realización de dicha fase consiste en aplicar un breve cuestionario de datos sociodemográficos, llevar a cabo la aplicación del enjuague oral a una muestra de 25 voluntarios que pueden ser docentes, alumnos y empleados, y darles una pequeña información relativa a temas de salud oral, lo cual demoraría alrededor de 5 minutos por participante. Al término del procedimiento, se daría un resultado presuntivo, que en caso de ser positivo, se daría consejo para su atención posterior. Se resguardará el anonimato de los participantes en todo momento.

Asimismo, le solicito de la manera más atenta las facilidades de un espacio pequeño para llevar a cabo el procedimiento que sería realizado por el investigador principal y dos personas de apoyo capacitados, quienes acudirían a las instalaciones de la institución en una única ocasión el día y hora disponible, llevando consigo todo el material necesario, acatando las disposiciones establecidas por la Facultad y respetando en todo momento el Protocolo de prevención sanitaria y seguridad laboral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

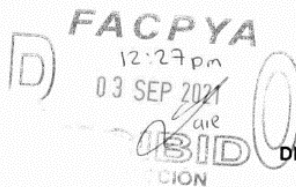
Los datos de contacto del investigador principal son: correo electrónico guillermocano\_verdugo@hotmail.com y teléfono celular mismo que se encuentra en total disposición de resolver las dudas que pudieran surgir. Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta y distinguida consideración y respeto.

Atentamente,  
 "Alere Flammam Veritatis"  
 Monterrey, N.L. a 30 de Agosto de 2021

**DRA. MARÍA GUADALUPE MORENO MONSIVÁIS**  
 Directora



DIRECCIÓN



Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460  
 Monterrey, Nuevo León, México  
 Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107



## Apéndice E

### Resultados Fase Preliminar

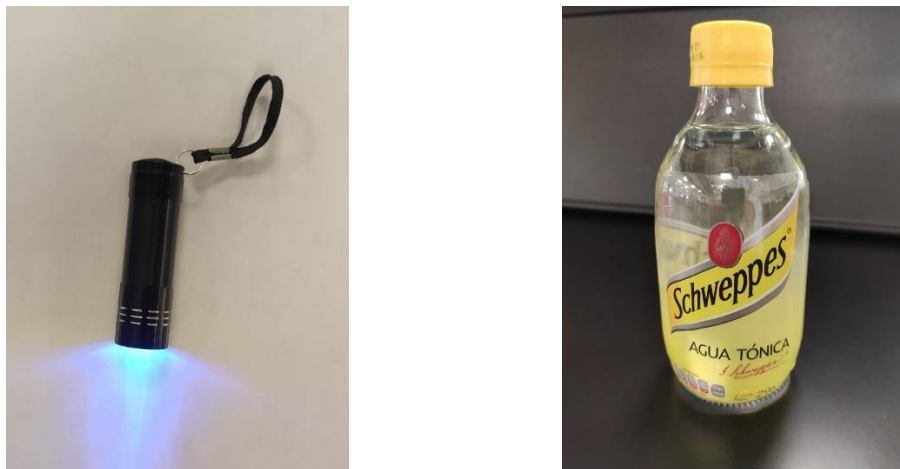
En este anexo se reportan los resultados obtenidos de la fase preliminar. Primero, se muestra la elaboración del biomarcador natural fluorescente y luz UV, posteriormente los resultados de la evaluación de la viabilidad comparando con el estándar de oro y finalmente el cultivo celular preliminar en un modelo *in vitro* de células sanas y malignas.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la Fase Preliminar: Diseño y Elaboración del Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV (figura 14).

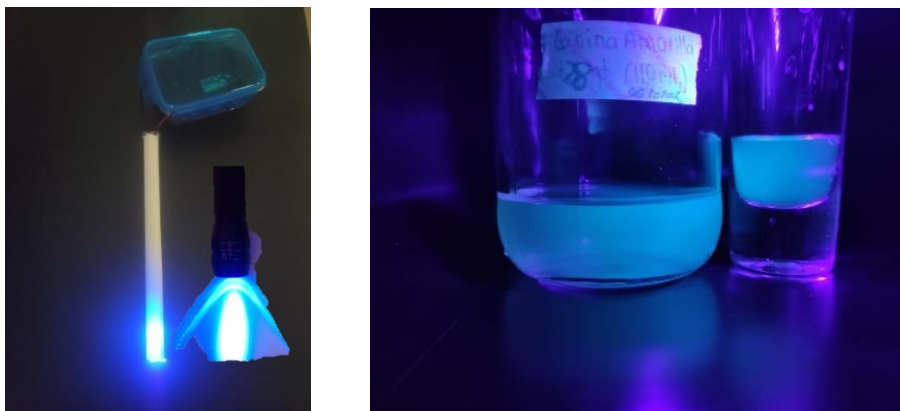


*Figura 14.* Biomarcador Natural Fluorescente (izquierda) y Luz UV (derecha).

Respecto a la evaluación de la viabilidad, se comparó el biomarcador natural fluorescente y luz UV contra el estándar de oro elegido: formulación fluorescente comercial y luz UV comercial como (figura 15 y 16). Los resultados fueron satisfactorios mostrando una fluorescencia exacta en ambas sustancias al ser iluminadas ante la luz UV en el caso del biomarcador natural fluorescente, y un brillo equivalente en el caso de la luz UV (figura 17).

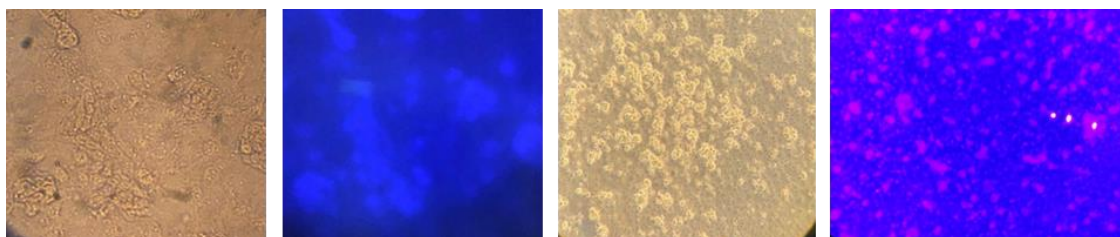


*Figura No. 15.* Luz UV de 12V marca FULL, modelo XML-T6+COB LED (izquierda) y formulación fluorescente agua tónica, presentación botella de vidrio de 296 ml. marca Peñafiel® (derecha) empleadas como estándar de oro en las pruebas de viabilidad de la Fase Preliminar.

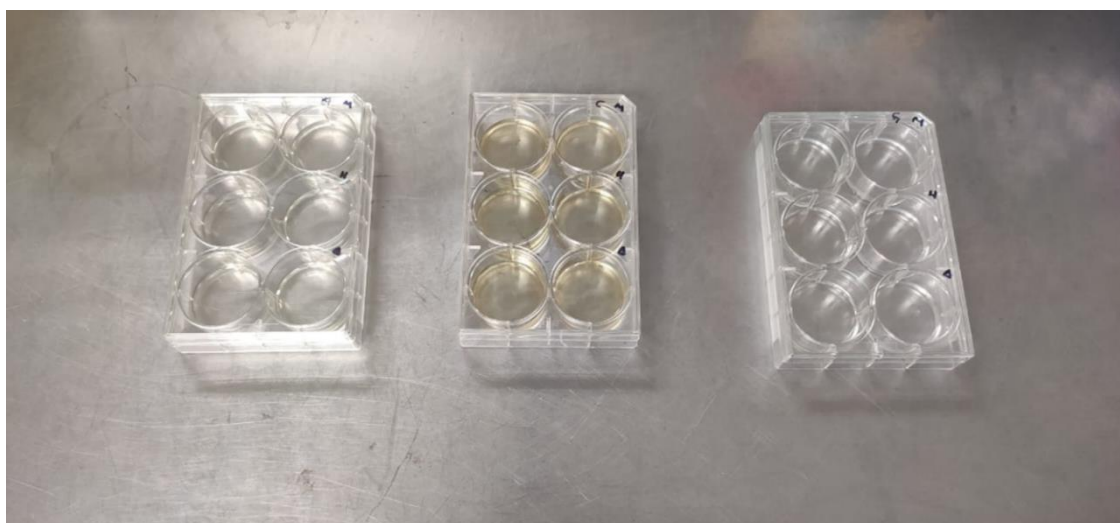


*Figura No. 16.* Evaluación de la viabilidad comparando contra el estándar de oro. Luz UV y Luz UV comercial (izquierda) y biomarcador natural fluorescente y formulación fluorescente comercial (derecha).

En relación a la viabilidad del estudio donde se evaluó la selectividad por células de cáncer, los resultados mostraron la selectividad de fluorescencia en células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™) mostrándose un tono liláceo claro en estas células, por el contrario, las células de fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™), las cuales fueron tomadas como control no brillaron ante el biomarcador natural fluorescente y luz UV, los cuales mostraron buenos resultados en la afinidad sobre células malignas, lo cual indica que la estrategia elegida es correcta y se continuó con la Fase I (figura 17 y 18).



*Figura No. 17.* Células Observadas al Microscopio en Pruebas de Viabilidad. De Izquierda a Derecha: Células Control sin Biomarcador Natural Fluorescente Ni Luz UV, Células Control Expuestas al Biomarcador Natural Fluorescente y de Luz UV, Células de Cáncer Cervical sin Biomarcador Natural Fluorescente ni Luz UV, y Células de Cáncer con Biomarcador Natural Fluorescente y Luz UV. Obsérvese la Tonalidad Fluorescente de Tono Violáceo en las Células de Lado Derecho, Indicando la Afinidad a Células Tumorales, por el Contrario, Células de Lado Izquierdo No Muestran Esa Afinidad.



*Figura No. 18.* Placas de cultivo de 6 pozos empleadas en el experimento. de izquierda a derecha: células de cáncer cervical HeLa (ATTC® CCL-2™); células fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™), células en co-cultivo HeLa (ATTC® CCL-2™) y fibroblastos gingivales humanos HGF (ATTC® PCS-201-018™).

## Apéndice F

### Glosario

- $\mu\text{L}$ : Microlitros
- CMV: Citomegalovirus
- $\text{CO}_2$ : Dióxido de carbono
- COCE: Carcinoma de Células Escamosas
- COVID-19: Coronavirus
- DMSO: Dimetil sulfoxido
- ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
- HeLa (ATTC® CCL-2™): Células de cáncer cervical
- HGF (ATTC® PCS-201-018™): Fibroblastos gingivales humanos
- HT-29 (ATCC® HTB-38™): Células de cáncer de colon
- ml: Mililitros
- MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PDB: Placa Dentobacteriana
- RPMI: Medio de cultivo celular "Roswell Park Memorial Institute"
- SFB: Suero Fetal Bovino
- STARD: Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies
- TFD: Terapia Fotodinámica
- UV: Ultravioleta
- V: Volts
- VEB: Virus del Epstein Barr
- VHS: Virus del Herpes Simple
- VPH: Virus del Papiloma Humano

## **Resumen Autobiográfico**

**M.C.S.P. Guillermo Cano Verdugo**

**Candidato a Doctor en Ciencias de Enfermería**

**Tesis:** EVALUACIÓN DE BIOMARCADOR NATURAL FLUORESCENTE PARA TAMIZAJE DE LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNAS EN POBLACIÓN ABIERTA

**LGAC:** Sexualidad responsable y prevención de ITS–VIH/SIDA

**Biografía:** Nacido en Guasave, Sinaloa, México el 24 de Abril de 1992. Hijo del Dr. Alejandro Cano Ochoa y la IBQ. Gabriela Verdugo López.

**Educación:** Formación media superior en el colegio “Sor Juana Inés de la Cruz de Guasave”, con carrera técnica en contabilidad. Formación superior egresado de la carrera de Cirujano Dentista en la Facultad de Odontología (2016) y de la Maestría en Ciencias en Salud Pública de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (2018), de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Especialidad en Salud Ocupacional, Universidad Autónoma del Noreste, UANE (2019). Becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para realizar estudios de Doctorado en la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el periodo 2019 – 2022.

**Experiencia Profesional:** Cirujano dentista en práctica privada de 2016 a la fecha. Docente y colaborador en los Departamentos de Autoaprendizaje de Idiomas y Formación Integral al Estudiante, Facultad de Odontología, UANL del año 2018 a la fecha.

**Asociaciones y membresías:** Miembro activo de la International Association for Dental Research (IADR), del año 2020 a la fecha.

**E-mail:** guillermo.canovrd@uanl.edu.mx