



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS
CIACYT-UASLP**

**Estudio del ácido siálico en saliva como biomarcador clínico para la
implementación de una herramienta adicional en el tamizaje de
cáncer cervicouterino, lesiones precancerosas y enfermedad
periodontal**

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS

Presenta:

I.N.E.R. Alondra Hernández Cedillo

Asesores de tesis:

Asesor principal: Dr. Hugo R. Navarro Contreras

Co-Asesora metodológica: Dra. Aida C. Hernández Arteaga

Co-Asesor clínico: Dr. José de Jesús Zermeño Nava

Resumen

Dedicatoria

“Si quiero volar, ya buscaré el modo de hacerlo. Siempre hay que hacer lo que te gusta, y lo demás no importa”.

-Extracto de la película “Little Miss Sunshine” del 2006.

A mi abuelita Jacinta por creer siempre en mis sueños.

A todas las mujeres que participaron en este proyecto.

Y a Cory, a mi mamá y mi papá por todo lo que han hecho por mí, esto es para ustedes.

Agradecimientos

Agradecimientos por apoyo financiero e instalaciones.

Agradecemos el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca de maestría 827587/618766.

Agradecemos a CONACYT México por el Proyecto Problemas Nacionales 2015-01-986, por el financiamiento de aspectos diversos del presente trabajo, de igual manera al Fondo de Apoyo a la Investigación FAI-UASLP 2017.

Agradecemos el acceso a las instalaciones del Laboratorio Nacional de Análisis Físicos, Químicos y Biológicos-UASLP, en especial el acceso al equipo Espectrómetro Raman Horiba del Laboratorio de crecimiento de películas monoatómicas perteneciente al Centro de Aplicación de la Radiación Infrarroja, Energías Alternativas y Materiales (CARIEM) de la CIACYT-UASLP y al acceso al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) del Laboratorio Nacional en Ciencias y Tecnologías en Terahertz (LANCYTT).

Agradecemos se nos haya brindado el acceso a las instalaciones del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P, así como también a las instalaciones en el Hospital General de Ciudad Valles del municipio

de Ciudad Valles, San Luis Potosí, S.L.P., de ambos agradecemos el apoyo brindado para ayudarnos a seleccionar y entrevistar a las pacientes durante el curso de esta investigación para el caso de las pacientes con lesiones precancerosas y cáncer cervicouterino.

Por último, agradecemos a la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) por ayudarnos a seleccionar y entrevistar a los pacientes durante el curso de esta investigación para el caso de las pacientes con enfermedad periodontal.

Agradecimientos por asistencia técnica.

- *Dr. José de Jesús Zermeño Nava*
- *Dr. Marco Ulises Martínez Martínez*
- *Dra. Nuria Patiño Marín*
- *Dr. Miguel José Yacamán*
- *Dra. Ana Luisa Pérez Rodríguez*
- *L.E. Amanda Martell Santos*
- *L.E. Esmeralda Hurtado*
- *Asistente de Jurisdicción Sanitaria no.5 Imelda Godoy Moreno*
- *L.E. Adriana*
- *Dr. Alberto Arenas Sánchez*
- *Dr. Gilberto Arteaga*
- *Dr. Sergio Vizcarra*
- *Dra. Montserrat Galarraga*
- *Dr. Hiram Joazet Ojeda Galván*
- *Dr. Jhon Eder Sánchez*
- *Dra. Ma. Guadalupe García Valdivieso*
- *Ing. Karí Guagalupe Hortensia Martínez Reyna*
- *M.C. José Gabriel Roberto Hernández Arteaga*
- *Mariana Valeria Gómez Victoria*
- *Lorena Godínez Hernández*
- *Estudiantes del Verano de la Ciencia UASLP 2018: Jennifer, Ana Luisa y Edson Daniel*

Agradecimientos personales.

Dicen que las personas que somos oriundas de la Huasteca somos muy agradecidos y completamente cierto, yo siempre digo una enorme cantidad de gracias al día y esta no es la excepción.

Agradezco a mi asesor el Dr. Hugo R. Navarro Contreras por su infinito apoyo durante la realización de este proyecto, por siempre impulsar mi carrera profesional y por todas las grandes aportaciones que hizo a este trabajo. Le estaré eternamente agradecida por darme la oportunidad de trabajar en este maravilloso proyecto al que le tengo mucho cariño.

Agradezco a mi co-asesora la Dra. Aida C. Hernández Arteaga por ser no sólo mi maestra sino también como una mamá para mí, muchísimas gracias por todo tu apoyo, por los consejos y por siempre decirme que: “La vida no es sólo ciencia, también hay que divertirse”. Te admiro y te estimo, aunque no lo diga tan a menudo.

Agradezco a mis sinodales: Dr. Ángel Gabriel Rodríguez Vázquez, Dr. Eleazar Samuel Kolosovas Machuca y la Dra. Harumi Moreno García por sus valiosos comentarios y aportaciones durante los avances realizados durante estos dos años, en especial quiero agradecer al Dr. Rodríguez Vázquez por el acceso al equipo de espectroscopía Raman, al Dr. Kolosovas Machuca por las excelentes clases de Bioestadística que tanto me hacían falta y a la Dra. Moreno García por hacerme notar algunos puntos de este proyecto para poder pulirlo.

Agradezco al Dr. José de Jesús Zermeño Nava y al Dr. Marco Ulises Martínez Martínez por ayudarme con los aspectos clínicos de este proyecto, por sus valiosas aportaciones y apoyo para la aprobación del comité de ética e investigación.

Quiero hacer un agradecimiento especial a la Dra. Ana Luisa Pérez Rodríguez, L.E. Esmeralda Hurtado y a Imelda Godoy Moreno por brindarme un gran apoyo para que se me permitiera la recolección de muestras del Hospital General de Ciudad Valles, este proyecto no hubiera sido posible sin ustedes. Agradezco a mis compañeros de maestría por acompañarme estos dos años de clases, tareas y exámenes, a Juan Roberto, Gregorio, Alfredo y Juan Manuel, gracias especiales a Juan Roberto por brindarme confianza en tiempos de crisis.

Agradezco también a mis compañeros de laboratorio: Hiram Joazet, Ma Guadalupe, Karí Guadalupe Hortensia y Mariana por el buen trabajo en equipo y la alegría que me brindaron durante la realización de este proyecto, agradecimiento especial a Karí Guadalupe Hortensia por ser mi compañera de viaje al congreso y brindarme un gran apoyo no sólo en lo profesional.

Agradezco a la estudiante de la carrera de Ing. en Nanotecnología y Energías Renovables Mariana Valeria por apoyarme de manera sobresaliente, de verdad, muchísimas gracias. Agradezco a mi amiga y colega, Ketzaly Anguiano por ayudarme en momentos clave de esta etapa, gracias por ser un ángel que ilumina mi camino.

Agradezco a mis amigos que viven a la distancia, pero que me hacen sentir cerca, a Greace por impulsarme a lograr todos mis sueños y por enseñarme a brillar siempre con luz propia; a Everth Donaldo por acompañarme todo este tiempo (y desde hace mucho antes) con innumerables consejos cinéfilos y de vida, por estar siempre presente y darme valentía en todo momento, gracias amigo, te estimo y lo sabes. Y, por último, a Amanda, esta tesis es también para ti amiga, mi agradecimiento es infinito por ayudarme de manera tan extraordinaria en este proyecto, por decir: “yo te ayudo, tú no te preocupes”, te estaré eternamente agradecida por esto, gracias por ser esa persona tan trabajadora que me inspira siempre.

Agradezco a mi familia potosina de amigas, a mi querida Ohana, que formamos tiempo atrás, a Oralia, Mitzi, Aleidita y Aranza, gracias por acompañarme en esta aventura desde sus inicios y llenarme de alegría, de igual manera quiero agradecer a la congregación de hermanas de Santa Vicenta María por acogerme en su casa, en especial a la hermana María Cristina Mora por ser un ángel para mí, le agradezco por creer en este sueño justo cuando se lo platiqué.

Un agradecimiento pequeño y especial a la música que me acompañó durante la escritura de este trabajo desde Rosalía, Lianne La Havas, Amy Winehouse, London Grammar, Natalia LaFourcade, René Dominique, Jorge Drexler, Phum Viphurit. y muchísimos otros, pero sobre a los maravillosos soundtracks de películas como Interstellar, Lalaland, Her y de series como This is us, gracias por acompañarme en este viaje.

Un agradecimiento profundo y muy especial a todas las mujeres que participaron en este proyecto, a todas las Marías, Sandras, Guadalupes, etc. que por cuestiones éticas no se me permite decir sus nombres completos, pero desde aquí mi agradecimiento por apoyar asombrosamente este proyecto que no hubiera sido posible sin su valiosa participación.

También quiero agradecer a Dios, porque me dio la fe que necesitaba justo en el momento más indicado.

Por último, agradezco a mi familia, a mi papá por enseñarme siempre a volar, por el espagueti western y el equilibrio, a mi mamá por enseñarme a amar lo que hago, por su positivismo ante toda adversidad y sobre todo por enseñarme que la vida es bella y a mi hermana Coral por tener una infinita paciencia conmigo siempre y a toda costa, por creer siempre en mí y ser mi faro de luz, los quiero tanto, todo este trabajo es para ustedes.

Índice general

Capítulo

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1. Cáncer Cervicouterino (CaCu)	3
2.2. Lesiones Precancerosas (NICs)	6
2.3. Enfermedad Periodontal	19
2.4. Espectroscopía Raman	23
2.4.1. Dispersión Raman Amplificada por Superficie (SERS)	28
3. Antecedentes	37
3.1. Ácido Siálico (AS)	37
3.2. Saliva	43
4. Metas y Objetivos	51
4.1. Hipótesis	51

4.2. Objetivos	51
4.2.1. Objetivos Generales	51
4.2.2. Objetivos Específicos	52
4.2.3. Objetivos Secundarios	52
4.3. Pregunta de Investigación	52
5. Estudio, Población y Muestra	53
5.1. Tipo de Estudio	53
5.2. Población y Muestra	54
5.3. Plan de Trabajo	57
5.4. Aspectos Éticos	59
6. Materiales y Metodología	61
6.1. Materiales y Equipo	61
6.2. Metodología Parte I: Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Plata	62
6.2.1. Síntesis de Nanopartículas de Plata (AgNPs)	62
6.2.2. Caracterización de Nanopartículas de Plata (AgNPs)	63
6.2.2.1 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	63
6.2.2.2 Espectroscopía de Transmisión Óptica	65
6.2.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	67
6.3. Metodología Parte II: Espectroscopía RAMAN-SERS	69
6.3.1. Calibración de Ácido Siálico	69
6.3.2. Muestras de Saliva	76
6.4. Metodología Parte III: Análisis Estadístico y de Diagnóstico	77
7. Análisis y Discusión de Resultados	87
7.1. Resultados Parte I: Lesiones Precancerosas y Cáncer Cervicouterino Invasor	87

7.2. Resultados Parte II: Periodontitis, Gingivitis y Control	100
8. Conclusiones	106
 Apéndice	
A. Glosario	108
B. Publicaciones, Congresos y Estancias	111
C. 1. Aprobación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de S.L.P	112
D. 1.1 Aprobación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de S.L.P	113
E. 2. Aprobación del Comité de Ética e Investigación para la Salud del “Hospital General de Ciudad Valles”, Cd. Valles, S.L.P	114
F. 3. Aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología de la UASLP	115
G. Ejemplo de Carta de Consentimiento Informado	116
H. 4. Hoja de recolección de datos para ambos hospitales	120
I. 4.1 Hoja de recolección de datos para ambos hospitales	121
Bibliografía	122

Índice de tablas

Tabla

2.1. Displasia correspondiente a las terminologías NIC y LIE utilizadas para clasificar las lesiones precursoras de cáncer cervicouterino [9]	8
2.2. Evaluación del valor predictivo negativo y positivo, sensibilidad y especificidad del frotis de Papanicolaou y colposcopia [15].	16
2.3. Evaluación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la detección de la enfermedad periodontal mediante profundidad del surco gingival.	23
3.1. Valores de concentración de ácido siálico en suero sanguíneo para los grupos de NICs y CaCu.	42
3.2. Valores de concentración de ácido siálico en suero sanguíneo para los grupos control, gingivitis y periodontitis.	42

3.3. Valores de concentración de ácido siálico en saliva en grupos: control, neoplasias malignas del útero, cérvix y ovario; y neoplasias malignas de pulmón.	48
3.4. Valores de concentración de ácido siálico en saliva en grupos: control, gingivitis y periodontitis.	48
7.1. Media y desviación estándar de los datos obtenidos (edad, peso, estatura y IMC) de los grupos: CaCu y NICs.	88
7.2. Concentraciones de AS (mg/dl) para los grupos de NICs y CaCu.	90
7.3. Media y desviación estándar de los datos obtenidos ((edad, peso, estatura y IMC) de los grupos: NIC1 y NIC2/3+CaCu.	95
7.4. Concentraciones de AS (mg/dl) para los grupos de NIC 1 y NIC2/3+CaCu	96
7.5. Media y desviación estándar de los datos obtenidos (edad, peso, estatura, IMC, profundidad del surco gingival y pérdida de inserción clínica) de los grupos: control, gingivitis y periodontitis.	101
7.6. Concentraciones de AS (mg/dl) para los grupos control, gingivitis y periodontitis.	103

Índice de figuras

Figura

2.1. Número de muertes estimadas mundiales en 2018 de todos los tipos de cáncer en población femenina de todas las edades [5].	4
2.2. Tasas de incidencia estandarizadas por edad estimadas en 2018 para cáncer cervicouterino de todas las edades [5].	5
2.3. Tasas de mortalidad estandarizadas por edad estimadas en 2018 para cáncer cervicouterino de todas las edades [5].	5
2.4. Número de muertes estimadas en México en 2018 de todos los tipos de cáncer en población femenina de todas las edades [6].	6
2.5. Progresión de las lesiones precancerosas del CaCu desde un cérvix normal hasta una NIC III (parte de arriba: vista completa del aparato reproductor, parte de abajo: vista del cérvix a través de la vagina) [8].	7
2.6. Estadificación del cáncer cervicouterino según la FIGO [10].	9
2.7. Estadificación del cáncer cervicouterino, supervivencia a 5 años y estado en la primera consulta [11].	10

2.8. Etapas clínicas de la periodontitis desde encía sana, gingivitis hasta periodontitis severa (crónica) [18].	19
2.9. Distribución del estado periodontal en población adulta por grupo de edad en México [20].	20
2.10. Diagnóstico periodontal mediante la profundidad del surco gingival [25].	22
2.11. Mecanismos de dispersión de la luz (a) Rayleigh, (b) Raman-Stokes y (c) Raman anti-Stokes [30].	25
2.12. Diagrama de rayos del micro-espectrómetro Raman [28].	27
2.13. Esquema de la dispersión Raman vs dispersión SERS.	29
2.14. Dibujo esquemático de un plasmón de resonancia superficial localizado [35].	33
2.15. Rangos de longitud de onda aproximados donde Ag, Au y Cu se han caracterizado bien y se han establecido para soportar SERS [40].	35
3.1. Estructura química del Neu5Ac [43].	39
3.2. La composición de la saliva.	44
5.1. Cuadro de variables para los grupos de estudio: NICs y CaCu.	55
5.2. Cuadro de variables para los grupos de estudio: sano, gingivitis y periodontitis.	57
6.1. Nanopartículas de plata.	63
6.2. Gráfico de medición de tamaño por DLS de AgNPs.	64
6.3. Gráfico de medición de potencial zeta por DLS de AgNPs.	65
6.4. Esquema de un espectrómetro UV-Vis [79].	66
6.5. Espectro de Transmisión Óptica en la región UV-Vis de AgNPs.	67
6.6. Construcción básica de un SEM [80].	68
6.7. Micrografía SEM de AgNPs a 2.5 mM.	69

6.8. Sustrato de aluminio para la medición Raman-SERS.	70
6.9. Espectros Raman del AS sólido y en solución a 200 mg/dl, y espectro SERS del AS+AgNPs.	71
6.10. Curva de calibración del AS+AgNPs a diferentes disoluciones.	72
6.11. Curvas de calibración.	73
6.12. Números de onda y asignación a los modos vibracionales de las bandas Raman y SERS experimental del Neu5Ac [41].	74
6.13. Modos vibracionales de las moléculas.	75
6.14. Comparación de los modos vibracionales Raman y SERS de Vinogra- dova et al. y Hernández-Cedillo.	76
6.15. Espectros SERS de disoluciones de AS (1 y 200 mg/dl) y de pacientes diagnosticadas con NICs (P1 y P2) y CaCu (P3 yP4).	77
6.16. Ajuste a la función logarítmica del modo vibracional 907 cm^{-1} del AS.	78
6.17. Ajuste a la función logarítmica del modo vibracional 1174 cm^{-1} del AS.	79
6.18. Ajuste a la función logarítmica del modo vibracional 1369 cm^{-1} del AS.	79
6.19. Resultados de una prueba diagnóstica [85].	82
6.20. Tipos de curva ROC [86].	85
7.1. A. Gráfico de nube de las concentraciones de AS de los grupos NICs y CaCu de ambos hospitales. B.Gráfico de caja de las concentraciones de AS de los grupos NICs y CaCu de ambos hospitales.	90
7.2. Curva ROC de las concentraciones de AS de los grupos NICs y CaCu.	91
7.3. Comparación de los datos obtenidos mediante frotis de Papanicolaou y prueba de AS en saliva en grupos de NICs y CaCu.	92
7.4. A. Gráfico de nube de las concentraciones de AS de los grupos NIC1 y NIC2/3+CaCu de ambos hospitales. B. Gráfico de caja de las concen- traciones de AS de los grupos NIC1 y NIC2/3+CaCu de ambos hospitales.	96

7.5. Curva ROC de las concentraciones de AS de los grupos NIC1 y NIC2/3+CaCu. 97

7.6. Comparación de los datos obtenidos mediante frotis de Papanicolaou y prueba de AS en saliva en grupos de NIC1 y NIC2/3+CaCu. 98

7.7. A. Gráfico de nube de las concentraciones de AS de los grupos control, gingivitis y periodontitis. B. Gráfico de caja de las concentraciones de AS de los grupos control, gingivitis y periodontitis. 102

7.8. Curva ROC de las concentraciones de AS de los grupos control y periodontitis. 103

7.9. Comparación de los datos obtenidos mediante profundidad del surco gingival y pérdida de inserción clínica por Machtei et al. y Michalowicz et al. y la prueba de AS en saliva. 105

Capítulo 1

Introducción

El cáncer es una enfermedad en la cual las células en el cuerpo se multiplican sin control. Cuando este comienza en el cuello del útero, se llama cáncer cervicouterino, cáncer de cérvix, o cáncer del cuello del útero. El cáncer se puede extender a otras partes del cuerpo posteriormente[1]. El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo. La mayoría de esas defunciones ocurren en países de ingresos bajos y medianos. La causa primaria de las lesiones precancerosas y del cáncer cervicouterino es la infección persistente o crónica por uno o más de los tipos “de alto riesgo” (u oncógenos) del virus del papiloma humano (VPH)[2].

En estos pacientes un sistema de marcadores tumorales (biomarcador) podría ser una herramienta adicional para derivar el estado del tumor (benigno, maligno). Subsecuentemente, tales marcadores pueden ser útiles para correlacionarse con la respuesta al tratamiento anti-cáncer y a la recurrencia de la enfermedad. Al existir incrementos en los niveles de ácido siálico, dicho biomarcador puede ser considerado como un biomarcador inflamatorio potencial que serviría para ayudar en el diagnóstico, tamizaje y/o monitoreo de la terapia de los pacientes diagnosticados con este tipo de cáncer. Así, utilizando

Espectroscopía Raman mediante la técnica de SERS (Dispersión Raman Amplificada por Superficie) con nanopartículas de plata (AgNPs) se busca determinar las concentraciones de ácido siálico en pacientes femeninas con cáncer cervicouterino invasor y con lesiones precancerosas para determinar si existe un incremento en la concentración de ácido siálico en saliva que nos permita determinar el estadio de las personas con respecto al desarrollo del cáncer. Existen pruebas previas con esta técnica en las cuales ya se ha medido la concentración de ácido siálico en mujeres con otro tipo de afecciones las cuales han proporcionado muestras de saliva y se les ha determinado la concentración de ácido siálico mediante esta metodología[3].

Así mismo, se pretende hacer una comparativa con mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino invasor y lesiones precancerosas para determinar si hay un incremento de este biomarcador, como también hacer la medición en una población sana, con enfermedad de gingivitis y con enfermedad periodontal, esto es para evitar que las enfermedades bucodentales (gingivitis y periodontitis) sean una variable confusora en el estudio del cáncer cervicouterino, debido a que la muestra es en saliva y puede causar confusión en la medición de esta por la cercanía de la saliva y la localización de dichas enfermedades.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1 Cáncer Cervicouterino (CaCu)

¿Qué es?

El cáncer es una enfermedad en la cual las células en el cuerpo se multiplican sin control. Cuando este comienza en el cuello del útero, se llama cáncer cervicouterino, cáncer de cérvix, o cáncer del cuello del útero, que denominaremos CaCu. El cáncer se puede extender a otras partes del cuerpo posteriormente, por el efecto conocido de la metástasis.

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es la causa principal de cáncer de cuello uterino en las mujeres [1].

Aunque la mayoría de los casos de cáncer cervicouterino se pueden prevenir mediante la detección y el tratamiento de rutina de las lesiones precancerosas, el cáncer cervicouterino es la principal causa de mortalidad por cáncer entre las mujeres en los países en desarrollo [4].

Estadísticas

El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública mundial. En 2018, a pesar de ser prevenible, el CaCu es el cuarto tipo de cáncer que produce más muertes en la

población femenina (ver Fig. 2.1 en color naranja) y el séptimo en todo el mundo, lo que representa aproximadamente 9 de cada 10 muertes por cáncer en regiones menos desarrolladas (87 %).

Los informes estadísticos de 2018 registraron 569,847 de casos nuevos, lo que representa una tasa de incidencia ajustada por edad de 13.1 por 100,000 mujeres. Las regiones de alto riesgo (con tasas de incidencia estandarizadas por edad estimadas de > 30 por 100,000 mujeres) incluyen África del Sur (43.1), Melanesia (22.7) y África media (26.8). Las tasas más bajas se presentaron en Australia/Nueva Zelanda (6.0) y en Asia occidental (4.1) (ver Fig. 2.2) también se registraron 311,365 de muertes con una tasa de mortalidad estandarizada por edad de 6.9 por 100,000 mujeres, de las regiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) África del Sur y Occidental tienen la mortalidad más alta en todo el mundo (20 y 30 muertes por 100,000, respectivamente) (ver Fig. 2.3). Si las tendencias actuales no cambian, el número de muertes en América Latina aumentará un 45 % para el año 2030. Las tasas de muerte son tres veces más altas en América Latina y el Caribe que en América del Norte, lo que evidencia sus enormes disparidades de salud. Aproximadamente el 85 % de las mujeres que mueren de CaCu residen en países en desarrollo [4],[5].

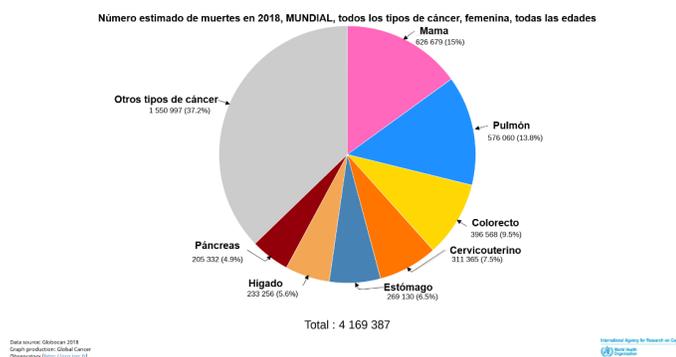


Figura 2.1: Número de muertes estimadas mundiales en 2018 de todos los tipos de cáncer en población femenina de todas las edades [5].

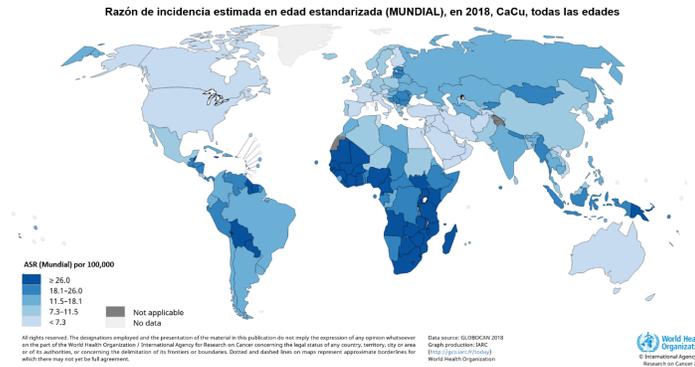


Figura 2.2: Tasas de incidencia estandarizadas por edad estimadas en 2018 para cáncer cervicouterino de todas las edades [5].

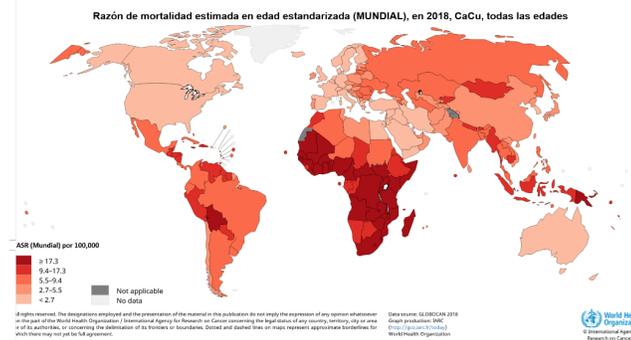


Figura 2.3: Tasas de mortalidad estandarizadas por edad estimadas en 2018 para cáncer cervicouterino de todas las edades [5].

En México, el cáncer cervicouterino se considera un problema de salud pública, y este cáncer es la segunda causa más común de tumores malignos en mujeres ≥ 25 años, sólo detrás del cáncer de mama que se encuentra en primer puesto (Ver Fig. 2.4). Su relevancia es considerable; es la neoplasia con la segunda tasa de incidencia más alta y la segunda causa de muerte entre las mujeres de todas las edades. Los grupos de edad más afectados son de 50 a 59 años y de 30 a 49 años. El CaCu representó el 7.5 % (190,667) de todos los casos nuevos de cáncer y el 9.6 % (83,476) del total de muertes femeninas por cáncer en 2018 [4].

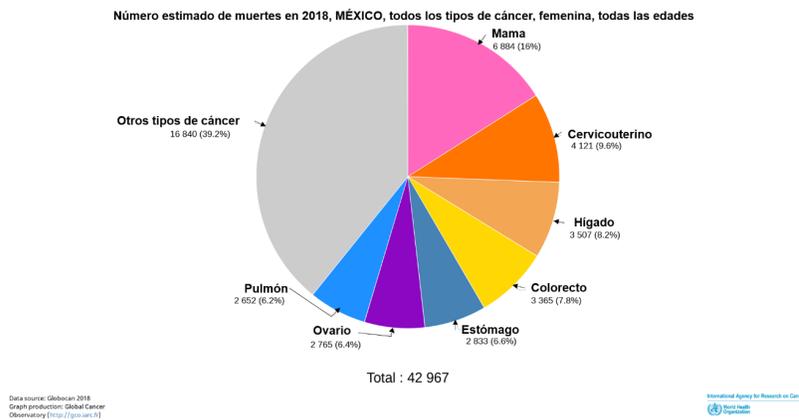


Figura 2.4: Número de muertes estimadas en México en 2018 de todos los tipos de cáncer en población femenina de todas las edades [6].

2.2 Lesiones Precancerosas (NICs)

Las lesiones precancerosas son una etapa precursora del cáncer cervicouterino. Estas lesiones pueden transformarse en cáncer a lo largo de muchos años si no se detectan. Aunque no hay una cura para la infección por VPH, las verrugas, lesiones y cambios precancerosos y cancerosos causados por el virus pueden ser tratados [1].

De acuerdo con la historia natural de CaCu se ha mostrado que este está precedido por una serie de lesiones celulares dentro del epitelio endocervical. Estas lesiones, consideradas como preinvasoras (precancerosas), son denominadas como Neoplasia Intraepitelial Cervicouterina (NIC) o Lesión Escamosa Intraepitelial (LEI) de acuerdo con el sistema Bethesda. Desde el punto de vista histológico la clasificación de LEI depende del grado de lesión celular dentro del epitelio y esta clasificación está diseñada para estandarizar el sistema de reporte para la prueba de Papanicolaou [7].

Las lesiones más invasivas están precedidas por una NIC o LEI. La mayoría de las NICs se desarrollan en la zona de transformación del cuello uterino, que se encuentra en la unión entre el epitelio columnar endocérvix y el epitelio escamoso ectocérvix. Esta área se denomina zona de transformación porque sufre un proceso de metaplasia epitelial

columnar hacia el orificio cervical externo en respuesta a diferentes factores, como el pH y los cambios hormonales, a lo largo de la vida de la mujer. Se clasifican como: NIC 1, en la que sólo se afecta el tercio inferior del epitelio; NIC 2, en la cual la lesión se extiende hasta el tercio medio del epitelio, y NIC 3, en la cual la lesión se ha extendido por todo el espesor del epitelio. El tiempo medio para un desarrollo de carcinoma in situ o una NIC 3 desde el momento de una infección inicial por VPH16 es de entre 7 y 12 años, mientras que en una NIC 1 positivo al VPH de alto riesgo, el tiempo de desarrollo es de 6 años [4] (Ver Fig. 2.5). En la Tabla 2.1 se puede ver la clasificación de acuerdo con la terminología NIC y LEI.

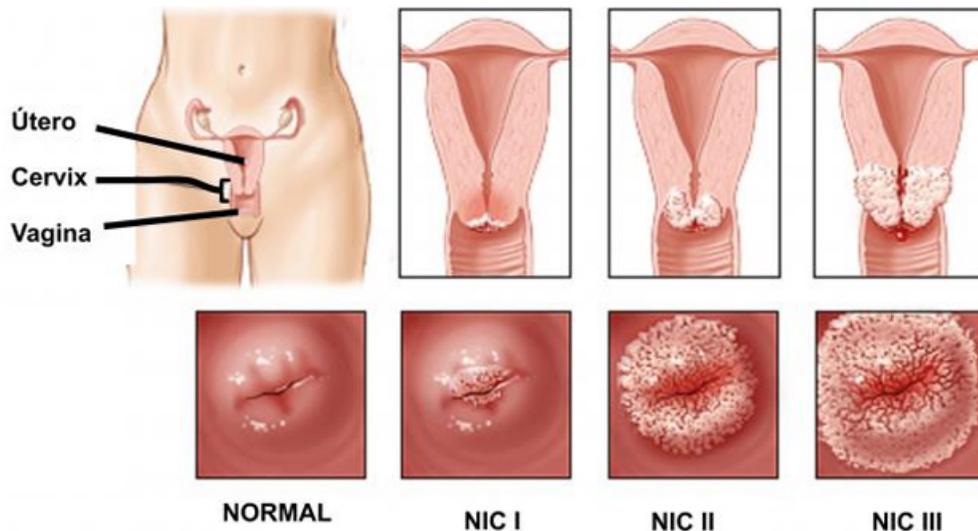


Figura 2.5: Progresión de las lesiones precancerosas del CaCu desde un cérvix normal hasta una NIC III (parte de arriba: vista completa del aparato reproductor, parte de abajo: vista del cérvix a través de la vagina) [8].

Tabla 2.1: Displasia correspondiente a las terminologías NIC y LIE utilizadas para clasificar las lesiones precursoras de cáncer cervicouterino [9]

Terminología de displasia	Terminología NIC	Terminología LIE (Sistema de Bethesda)
Displasia leve o discariosis, atipia coilocitótica, condiloma plano (antiguo Papanicolaou clase III)	NIC 1 (I)	Lesión Intraepitelial Escamosa de bajo grado
Displasia moderada o discariosis (antiguo Papanicolaou clase IV)	NIC 2 (II)	Lesión Intraepitelial Escamosa de alto grado
Displasia grave o discariosis (Papanicolaou antiguo clase IV)	NIC3 (III)	Lesión Intraepitelial Escamosa de alto grado
Carcinoma in situ (antiguo Papanicolaou clase V)	NIC3 (III)	Lesión Intraepitelial Escamosa de alto grado

Factores de riesgo

Los estudios indican que la infección persistente con el VPH es un requisito necesario para el desarrollo del CaCu. Se transmite por contacto sexual, afectando a 8 de cada 10 personas (hombres y mujeres) en algún momento de su vida. Sólo una mujer de cada 10 que adquiere esta infección desarrollará el cáncer. Algunos factores de riesgo son los siguientes:

- Consumo de tabaco
- Enfermedades de transmisión sexual como el herpes y clamidia
- Uso de hormonas orales
- Deficiencias nutricionales
- Edad de inicio de la actividad sexual y ausencia de protección durante la adolescencia
- Múltiples parejas sexuales [4]

Etapas clínicas

En el CaCu, la asignación de etapas se basa en datos clínicos. Se requiere experiencia para que la prueba sea reproducible y confiable. Por lo tanto, las reglas de estadificación clínica se basan en exploraciones clínicas ginecológicas realizadas por un experto, preferiblemente mientras la paciente se encuentra bajo anestesia (aunque esto depende

del centro de salud). En 2009, la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO, por sus siglas en inglés) estableció lo siguiente (Ver Fig 2.6 y Fig. 2.7) [4]:

Etapa	Descripción
I	Tumor confinado al cuello uterino
IA	Tumor con invasión diagnosticado por patología con una profundidad máx. de 5 mm medida desde la capa basal y una extensión horizontal menor o igual a 7 mm
IA1	Invasión estromal menor o igual a 3mm y extensión horizontal menor o igual a 7 mm
IA2	Invasión estromal mayor de 3 mm, pero menor de 5 mm y extensión horizontal menor o igual a 7 mm
IB	Tumor clínicamente visible confinado al cérvix o etapas preclínicas mayores al estadio IA
IB1	Lesión clínicamente visible menor o igual a 4 cm en su dimensión mayor
IB2	Lesión clínicamente visible mayor de 4 cm en dimensión mayor
II	Tumor que se extiende más allá del cuello uterino sin llegar a la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina
IIA	Tumor que invade fondos de saco vaginal sin invasión parametrial
IIA1	Tumor menor de 4 cm
IIA2	Tumor mayor de 4 cm
IIB	Tumor con invasión parametrial, sin llegar a la pared pélvica
III	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal
IIIA	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina y no se extiende a la pared pélvica
IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal
IV	El tumor se extiende fuera de la pelvis, se comprueba por biopsia de la mucosa vesical o rectal. El edema buloso no se considera enfermedad metastásica
IVA	El tumor invade a la mucosa de la vejiga o recto y/o se extiende más allá de la pelvis
IVB	Metástasis a distancia

Figura 2.6: Estadificación del cáncer cervicouterino según la FIGO [10].

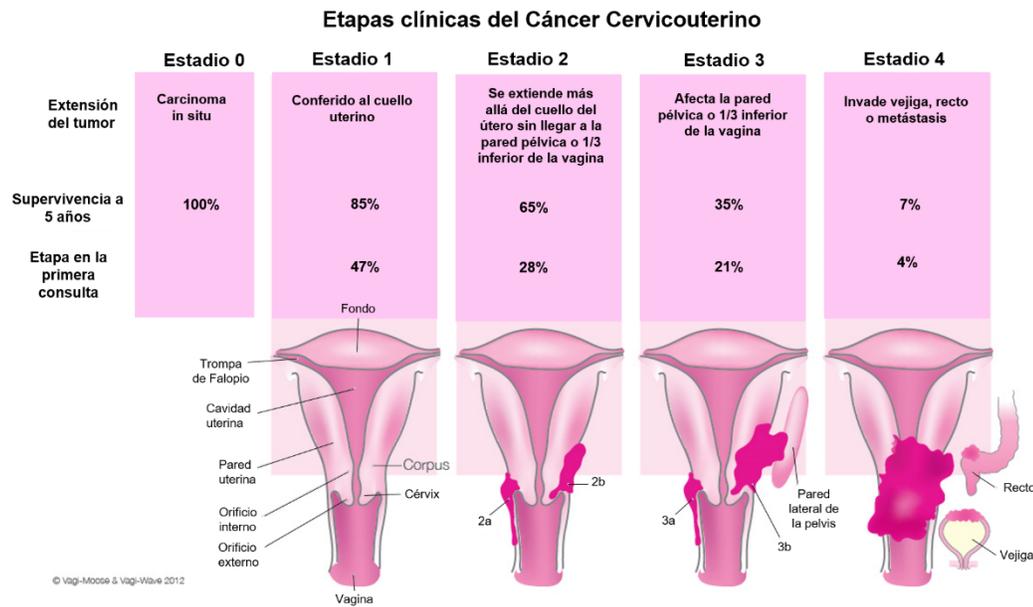


Figura 2.7: Estadificación del cáncer cervicouterino, supervivencia a 5 años y estado en la primera consulta [11].

Métodos de tamizaje

El tamizaje es una intervención de salud pública dirigida a una población destinataria asintomática. El tamizaje no tiene por objeto diagnosticar una enfermedad, sino identificar a las personas con mayor probabilidad de tener la enfermedad o un precursor de esta.

El resultado positivo primario del tamizaje es la reducción de los casos de cáncer cervicouterino mediante la detección y tratamiento de las lesiones precancerosas antes de que progresen hacia un cáncer. Además, el tamizaje permite detectar el cáncer cervicouterino en su fase inicial, cuando todavía puede ser tratado eficazmente.

Los riesgos del tamizaje es una tasa variable de sobre detección de lesiones precancerosas (es decir, falsos positivos), que conduce al tratamiento innecesario de mujeres que, de hecho, no corren mayor riesgo de cáncer invasor en ese momento. No obstante, los beneficios de detectar precozmente las lesiones precancerosas (es decir, positivos

verdaderos) deriva en un tratamiento para prevenir su evolución hacia un cáncer.

Una buena prueba de tamizaje de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) [2] debe cumplir con los siguientes requisitos:

- Exactitud: la prueba confirma con alta probabilidad resultados correctos.
- Reproducibilidad: la repetición de una misma prueba dará el mismo resultado.
- Bajo costo: posibilidad para el sistema de salud en cuanto a recursos financieros y humanos para todas las pacientes y sus familias en cuanto al acceso a los servicios necesarios.
- Facilidad relativa: aplicable sin dificultades, posibilitando también sin dificultades el seguimiento de las mujeres con resultados anormales.
- Aceptabilidad: es bien tolerada por la paciente y por el dispensador.
- Seguridad: el procedimiento de ejecución de la prueba y el manejo de los casos positivos tienen efectos adversos mínimos o nulos.
- Disponibilidad: es accesible para toda la población destinataria.

Se debe hacer una mención considerable de los criterios de tamizaje clásico de Wilson y Junger de 1968 adoptados por la comunidad médica [12], son los siguientes:

1. La condición buscada debe ser un problema de salud importante.
2. Se requiere un tratamiento aceptado para pacientes con enfermedad reconocida.
3. Las instalaciones para el diagnóstico y tratamiento deben estar disponibles.
4. Debe haber una etapa sintomática latente o temprana reconocible.
5. Debe existir una prueba o examen adecuado.

6. La prueba debe ser aceptable para la población.
7. La historia natural de la afección, incluido el desarrollo de una enfermedad latente a una enfermedad declarada, debe entenderse adecuadamente.
8. Debe estar establecida una política acordada sobre a quién tratar como pacientes.
9. El costo de la detección de casos (incluido el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes diagnosticados) debe ser económicamente equilibrado en relación con los posibles gastos en atención médica en general.
10. La búsqueda de casos debe ser un proceso continuo y no un proyecto “de una vez por todas”.

En teoría, la mejor prueba de tamizaje es la que tenga la tasa más baja de falsos negativos o mayor especificidad estadística. Los falsos negativos pueden dar lugar a un mayor riesgo de cáncer si no hay tamizaje frecuente disponible. Los falsos positivos pueden dar lugar a tratamientos innecesarios y provocar mayor ansiedad para las pacientes [2]. El CaCu es prevenible mediante el tamizaje de las mujeres asintomáticas con el fin de detectar y tratar las lesiones precancerosas antes de que progresen a enfermedad invasora. Los estudios indican que, si una mujer se sometiera a una prueba de tamizaje de cáncer cervicouterino al menos una vez en la vida entre 30 y 40 años, su riesgo de padecer esta enfermedad se reduciría entre un 25 y 36 % [13].

Los métodos de tamizaje actuales para cáncer cervicouterino son los siguientes [4]:

■ **Método molecular: Detección de ADN de VPH.**

- **Procedimiento:** La muestra, que puede ser tomada por el médico o por la paciente misma, se coloca en un tubo con una solución conservante

apropiada y se envía al laboratorio (o se procesa de inmediato en el lugar si se utiliza una prueba nueva).

- **Puntos fuertes:**

- La extracción de la muestra es tan sencilla que la puede hacer la paciente misma.
- El resultado del análisis es definitivo.
- Si se aplica una prueba nueva, que se procesa en el lugar y da resultados rápidos, un resultado positivo puede ir seguido de un tratamiento inmediato (visita única).

- **Limitaciones:**

- Requiere suministros y equipos patentados, que pueden no ser fácilmente accesibles.
- El costo unitario suele ser elevado.
- El almacenamiento del material necesario para las pruebas pueden ser problemático.
- En general, los requisitos de laboratorio y transporte de las muestras son complejos.
- Aunque la prueba está disponible actualmente, su resultado no estará disponible de inmediato, por lo que la paciente deberá hacer múltiples visitas y ello aumenta el riesgo de que no regrese para el seguimiento.

- **Método de tamizaje visual: Inspección visual con ácido acético (IVAA).**

- **Procedimiento:** Un personal capacitado examina el cuello uterino no menos de 1 minuto después de aplicar ácido acético del 3 al 5 % para visualizar cambios en las células del cuello uterino.

- **Puntos fuertes:**

- Este método es relativamente sencillo y de bajo costo.
- Los resultados están disponibles de inmediato.
- La IVAA puede ser realizada por una amplia variedad de personal después de una capacitación breve.
- Los requisitos de infraestructura son mínimos.
- Un resultado positivo puede ir seguido de tratamiento inmediato (visita única).

- **Limitaciones:**

- Después de la capacitación, los dispensadores de IVAA necesitan una supervisión inicial, un control de calidad y una educación (perfeccionamiento) continuos, y garantía de la calidad.
- La evaluación es subjetiva; la exactitud de los resultados es muy variables según los médicos.
- La IVAA no es apropiada para muchas mujeres posmenopáusicas.

- **Método de tamizaje citológico: a. Citología convencional (frotis de Papanicolaou).**

- **Procedimiento:** El dispensador toma una muestra de células del cuello uterino utilizando una espátula o un cepillo pequeño, fija la muestra sobre un portaobjetos y la envía a un laboratorio para que la examine una persona capacitada.

- **Puntos fuertes:**

- Este método ha demostrado ser eficaz para reducir el cáncer cervicouterino en el contexto de un sistema en buenas condiciones.

- Es ampliamente aceptado en los países de altos recursos.
- La capacitación y los mecanismos de control y garantía de calidad están bien establecidos.

- **Limitaciones:**

- El método es difícil de introducir y mantener.
- Se necesitan sistemas para garantizar el seguimiento de las mujeres con resultado positivo en el tamizaje.
- Se requiere el transporte de las muestras al laboratorio y de los resultados al consultorio.
- Los programas de citología requieren control de calidad y garantía de la calidad clínica y de laboratorio.
- La interpretación es subjetiva.
- Los resultados no están disponibles de inmediato, de manera que se requieren múltiples visitas, aumentando el riesgo de pérdida para el seguimiento.

- **Método de tamizaje citológico: b. Citología en base líquida (CBL).**

- **Procedimiento:** El médico toma una muestra de células del cuello uterino con una espátula o un cepillo pequeño, la sumerge en una solución conservante y la envía a un laboratorio para su procesamiento y la examina una persona capacitada.

- **Puntos fuertes:**

- Si los patólogos son competentes, el examen de las muestras de CBL lleva menos tiempo.
- Las muestras también se pueden utilizar para el análisis molecular (como detección de ADN de VPH).

- La capacitación y los mecanismos de control y garantía de la calidad están bien establecidos.

● **Limitaciones:**

- Los suministros y medios de laboratorio para la CBL son más costosos que para la citología convencional.
- Otras limitaciones son las mismas que las de la citología convencional.

Analizando el frotis de Papanicolaou (Pap)

La prueba del frotis de Papanicolaou (Pap) se ha utilizado durante más de 50 años para detectar mujeres asintomáticas con anomalías citológicas, y las mujeres con citología anormal se remiten para pruebas posteriores, como colposcopia y biopsia directa (pruebas de oro) [14] (ver Tabla 2.2 donde se comparan porcentajes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo para las pruebas mencionadas anteriormente).

Tabla 2.2: Evaluación del valor predictivo negativo y positivo, sensibilidad y especificidad del frotis de Papanicolaou y colposcopia [15].

Método	Valor predictivo negativo (%)	Valor predictivo positivo (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Frotis de Papanicolaou	92	26	57	76
Colposcopia	96	52	92	67

La detección y la prevención son los factores más críticos para reducir la incidencia del cáncer cervicouterino. Los programas de detección citológicos actuales que utilizan la prueba de Papanicolaou han reducido significativamente la incidencia del CaCu. A pesar del éxito de la prueba de Papanicolaou, su baja sensibilidad sigue siendo un problema, y se han propuesto varias técnicas auxiliares para aumentar la fidelidad de los diagnósticos [13].

En las campañas de detección, la técnica más útil hasta ahora ha sido el frotis de Papanicolaou, sin embargo, tiene algunos puntos débiles, incluidos los resultados de “falsos positivos” que conducen a biopsias innecesarias y repetitivas; aún peor son los resultados “falsos negativos”, donde los cambios pasan desapercibidos. Estos hechos, en conjunto con los problemas socioculturales de países como África, retrasan aún más la detección exitosa y el tratamiento estándar de la enfermedad. La raza, el grupo étnico y el estado de inmigración contribuyen a la alta prevalencia de CaCu. Al hacer que la exploración pélvica y el muestreo del frotis de Papanicolaou sean una práctica prohibida debido a las barreras culturales y lingüísticas.

En México, el programa de detección de cáncer cervicouterino se implementó en 1974, con el objetivo de detectar lesiones precursoras, así como disminuir el número de carcinomas invasivos. Respecto a la adquisición de muestras de baja calidad estas se deben a la falta de área de transformación de la muestra, una técnica de extensión deficiente y al procesamiento o la fijación inadecuada de la muestra. Los errores en la interpretación se deben a un seguimiento deficiente y la falta de capacitación del personal. El muestreo de calidad es crucial para eliminar los diagnósticos falsos negativos y falsos positivos y, por lo tanto, es el factor más importante para mejorar la sensibilidad de las pruebas citológicas.

El Pap debe realizarse cuando comienza la vida sexual activa y luego cada 2 años; siempre que los resultados sean negativos, las pruebas deben realizarse cada 3 años hasta que la paciente cumpla 65 años [4].

A pesar de la aceptación de las pruebas citológicas como el método de detección primario para el cáncer cervicouterino, se ha mostrado que tienen una tasa alta de falsos negativos. El frotis de Papanicolaou mostró una sensibilidad baja para la detección de NIC 2 e incluso una sensibilidad más variable según la edad de la mujer, más alta en el grupo de 50 años y más. En un análisis de Spence et al., la tasa de falsos negativos de las pruebas citológicas fue tan alta como el 35.5 % en promedio. También se ha demos-

trado que las pruebas citológicas tienen una especificidad más baja para la NIC de alto grado que las lesiones de bajo grado, lo que puede conducir a un tratamiento excesivo. Además, la sensibilidad del frotis de Papanicolaou para el adenocarcinoma es menor que para el carcinoma de células escamosas. Debido a esto y la creciente incidencia de adenocarcinoma, que representa casi una cuarta parte de todos los cánceres de cuello uterino diagnosticados recientemente, las pruebas citológicas continuarán siendo menos útiles.

Además de sus limitaciones con respecto a la baja sensibilidad, las limitaciones de la prueba de Papanicolaou también incluyen el hecho de no adquirir muestras adecuadas, sesgo interobservador y malas interpretaciones. La inflamación, la escasa celularidad y las muestras que contaminan la sangre se han citado como razones para muestras inadecuadas o insatisfactorias. Aproximadamente del 1 % al 8 % de los frotis de Papanicolaou han sido reportados como insatisfactorios.

En un ensayo, cuando se reevaluaron las muestras inadecuadas, se observó atipia citológica que incluía lesiones de alto grado y carcinoma en el 7 % de las muestras. Incluso con muestras satisfactorias, la interpretación citológica está sujeta a la variabilidad inter observador a pesar de los estándares internacionales. Woodhouse et al. mostró que la discrepancia entre las lesiones de grado bajo y alto grado oscila entre el 9 % y el 15 % entre los diferentes laboratorios y su personal.

Las pruebas de detección más efectivas deben lograr un equilibrio entre alta sensibilidad y especificidad aceptable. De igual manera es importante identificar un intervalo de detección que sea lo suficientemente frecuente como para detectar lesiones antes de que se conviertan en invasivas, al tiempo que minimiza el costo y la morbilidad asociada con el tratamiento excesivo. Esto garantiza la baja probabilidad de que se presente un resultado anormal, en este caso el CaCu invasivo, antes de la próxima cita de cribado (o tamizaje). Debido a su baja sensibilidad, las pruebas citológicas por sí solas requieren exámenes regulares con un seguimiento constante.

En un análisis realizado por Spence et al., menciona que incluso cuando se dispone de un cribado opcional, el 65 % de las mujeres tenía antecedentes de cribado deficientes y el 14 % de las mujeres tenían un seguimiento deficiente después de una prueba de Papanicolaou anormal. Por lo tanto, una prueba de detección con un alto valor predictivo negativo, que permita de manera segura la extensión de los intervalos de detección, es una necesidad actual que deberá producir mayores beneficios [14].

2.3 Enfermedad Periodontal

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que ocasiona la destrucción de los tejidos de soporte del diente, el grado de destrucción difiere ampliamente entre las distintas formas de esta enfermedad (ejemplos: periodontitis agresiva y periodontitis crónica), la destrucción periodontal es un proceso episódico con estadios de destrucción activa, seguida de periodos de remisión, además de ser de sitio específico, la etiología se atribuye a un complejo rol de algunas de las especies bacterianas que se encuentran en la cavidad bucal [16].

La enfermedad periodontal tiene muchos estados o etapas, que van desde gingivitis fácilmente tratable a periodontitis grave e irreversible [17]. En la Fig. 2.8 se ilustran estas etapas clínicas:

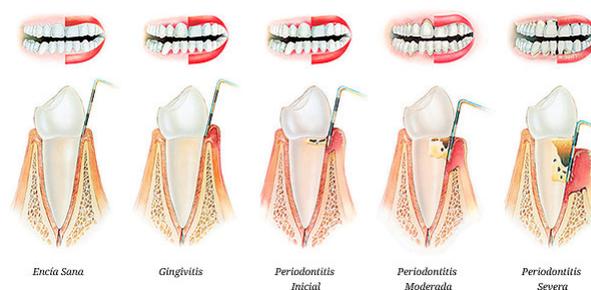


Figura 2.8: Etapas clínicas de la periodontitis desde encía sana, gingivitis hasta periodontitis severa (crónica) [18].

La enfermedad periodontal al igual que la caries son los padecimientos bucodentales con mayor prevalencia a nivel mundial. En México se ha reportado hasta en 70 % de la población (según la Academia Americana de Periodoncia) y se presenta principalmente en adultos mayores (de 65 años en adelante) (ver en la Fig. 2.9 la distribución del estado periodontal en población adulto por grupo de edad en México) [19].

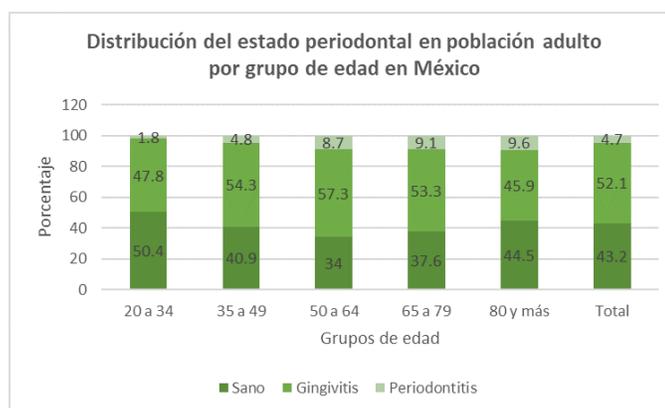


Figura 2.9: Distribución del estado periodontal en población adulta por grupo de edad en México [20].

La periodontitis crónica es la más común de las formas de periodontitis, tiene su expresión significativa en la edad adulta, es decir, se manifiesta alrededor de los 35 años, para su desarrollo requiere de una gingivitis precursora, aunque no todas las gingivitis progresan a periodontitis [16]. La periodontitis crónica se ha clasificado como localizada o generalizada dependiendo de si están involucrados <30 % o >30 % de los sitios. La gravedad se basa en la cantidad de pérdida de inserción clínica (CAL) y se designa como leve (1-2 mm CAL), moderada (3-4 mm CAL) o grave (>5 mm CAL). La gingivitis representa un espectro de enfermedades cuyo inicio se atribuye comúnmente a la presencia de bacterias, pero existen otras formas de gingivitis que no están relacionadas principalmente con la placa. Las enfermedades sistémicas como la diabetes y la leucemia pueden exacerbar la gingivitis asociada a la placa, al igual que los cambios

endocrinos (pubertad, embarazo), medicamentos (nifedipina, ciclosporina y fenitoína) y desnutrición (deficiencia de vitamina C) [21].

Las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis) son las enfermedades crónicas más prevalentes que afectan a la población en todo el mundo. La gingivitis es una inflamación de la encía debido a la acumulación de placa y afecta al 50 % de la población adulta [22].

La periodontitis es un caso que afecta a la encía del ser humano y provoca una inflamación que resulta de infecciones bacterianas. La periodontitis es una enfermedad común debido a la mala higiene oral, el tabaquismo y enfermedades sistémicas. Una placa (pegajosa, biopelícula bacteriana) y sarro (placa calcificada) se acumulan a lo largo de la encía y causan inflamación [23]. Los estudios epidemiológicos demuestran que el progreso de la enfermedad es generalmente lento y continuo y la severidad se relaciona directamente con la placa bacteriana y cálculo dental [16].

Las enfermedades periodontales se caracterizan por una reacción inflamatoria crónica de la membrana periodontal y de los tejidos que rodean la encía como resultado de la estimulación local persistente por las bacterias en la placa dental y por sus metabolitos. Además, la saliva desempeña un papel importante en el inicio y el curso de la inflamación, y en diversas infecciones en la cavidad oral [24].

La prevalencia y severidad de la pérdida ósea aumenta con el incremento de la edad no debido a la edad “per se” sino por el efecto acumulado de la destrucción periodontal ocasionada por los factores irritativos locales tales como la placa bacteriana y el cálculo. La asociación entre la enfermedad periodontal, la educación y el estado socioeconómico ha sido estudiada varias veces. En general, a medida que disminuye la educación aumenta la prevalencia y la severidad de la enfermedad periodontal, además, conforme aumentan los ingresos, mejora el estado periodontal. Las personas con más educación e ingresos tienen mayor acceso al tratamiento odontológico y a planes preventivos de salud, además de llevar a cabo una mejor higiene bucal [16].

Al diagnosticar la extensión de la enfermedad periodontal, la profundidad del surco gingival es un buen indicador del avance de la enfermedad. En un periodonto sano, no hay pérdida de unión epitelial o formación de bolsa, dicha bolsa periodontal tiene menos de 2 mm de profundidad. Las bolsas periodontales se pueden extender entre 4 y 12 mm. Clínicamente, los pacientes con bolsas periodontales de 4 mm o más son diagnosticados con periodontitis. Los pacientes con bolsas periodontales de 6 mm o más se diagnostican con periodontitis avanzada o grave (ver Fig. 2.10 para la medición de las bolsas periodontales) [17].



Figura 2.10: Diagnóstico periodontal mediante la profundidad del surco gingival [25].

Debido a los síntomas mínimos como el sangrado gingival y la pérdida de inserción, muchas personas se niegan a tratar su enfermedad. Si no se trata, la gingivitis puede progresar a periodontitis irreversible, lo que resulta en la pérdida de dientes. Una vez diagnosticadas, la mayoría de las enfermedades periodontales pueden ser tratadas con éxito. Los objetivos terapéuticos en la enfermedad periodontal son: primero, alterar o eliminar el origen de los microbios, así como factores de riesgo contribuyentes, evitando así la progresión de la enfermedad y preservando el estado saludable del periodonto. En segundo lugar, se debe prevenir la recurrencia de la periodontitis. Finalmente, en casos severos, debe intentarse la regeneración de las uniones periodontales [17].

Los resultados de las pruebas diagnósticas para la detección de la enfermedad periodontal mediante profundidad del surco gingival fueron publicados por Machtei et al. en 1993 [26] y Michalowicz et al. [27] en 2013 en los que se obtuvieron los siguientes porcentajes mostrados en la Tabla 2.3:

Tabla 2.3: Evaluación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la detección de la enfermedad periodontal mediante profundidad del surco gingival.

	Machtei et al. [26] 1993	Michalowicz et al. [27] 2013
Sensibilidad (S)	59 %	57 %
Especificidad (E)	96 %	91 %
Valor Predictivo Positivo (VPP)	16 %	70 %
Valor Predictivo Negativo (VPN)	12 %	86 %

2.4 Espectroscopía Raman

En 1928, C. V. Raman, demostró el concepto de dispersión inelástica de fotones en la interacción con la materia. La frecuencia de los fotones emitidos se desplaza a un valor más bajo o más alto en comparación con la frecuencia de los fotones incidentes, y este fenómeno se denomina efecto Raman [28]. La espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica empleada para el análisis cualitativo y ahora cuantitativo de prácticamente cualquier material, ya sea orgánico o inorgánico. Las principales ventajas radican en que no es necesaria ninguna preparación de la muestra a estudiar y que se trata de un proceso no destructivo [29].

El fundamento físico de la técnica está basado en el efecto Raman y consiste en la dispersión inelástica de una fracción de la luz incidente en la muestra, la cual sufre entonces un cambio de frecuencia debido al intercambio de energía con la materia en dicha colisión, según la ecuación de energía de los fotones:

$$\Delta E = h\Delta\nu$$

Donde h es la constante de Planck y ν la frecuencia de la luz incidente.

El procedimiento de medida es el siguiente: un haz de luz monocromático, de frecuencia ν_0 , incide sobre la muestra, dispersándose de manera elástica (dispersión Rayleigh) en su

mayor parte, pero existiendo una cantidad de luz que ha sido dispersada inelásticamente, y por tanto presenta un cambio en su frecuencia. Estos cambios en la frecuencia son característicos de la naturaleza química y del estado físico de la muestra, y por tanto son los datos que permiten identificar distintos compuestos y características moleculares.

Microscópicamente, este efecto se puede describir como una excitación de la nube electrónica de la molécula debido a la interacción con el fotón incidente. Este provoca que la excitación de la molécula pase a un estado excitado virtual, luego emite otro fotón con el objetivo de regresar al estado fundamental. Sin embargo, si el choque ha sido inelástico y se ha perdido o ganado energía, la molécula no volverá exactamente al mismo estado, sino que se encontrará en un estado rotacional o vibracional distinto del inicial. La diferencia de energía entre estos estados es lo que modifica la frecuencia del fotón emitido. Según la frecuencia de los fotones dispersados, se pueden distinguir los siguientes casos (pueden verse en la Fig. 2.11):

1. Dispersión Rayleigh (a): Cuando el choque es elástico, la frecuencia del fotón incidente y emitido es la misma, y por tanto no hay ninguna variación energética. Este proceso no proporciona información espectroscópica.
2. Dispersión Raman-Stokes (b): Si el choque es inelástico, y la frecuencia del fotón emitido es menor, quiere decir que ha transferido energía a la molécula, la cual se encontrará ahora en un estado vibracional o rotacional superior a la inicial.
3. Dispersión Raman Anti-Stokes (c): También para choques inelásticos, pero con frecuencias mayores del fotón. En este caso, la molécula no se encontraba en el estado fundamental, y al proporcionar energía al fotón, decae al estado de mínima energía [29].

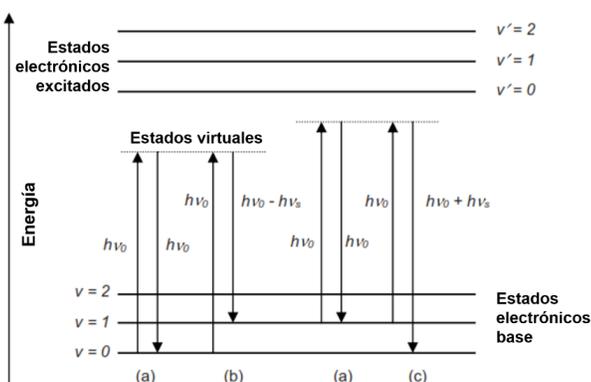


Figura 2.11: Mecanismos de dispersión de la luz (a) Rayleigh, (b) Raman-Stokes y (c) Raman anti-Stokes [30].

En general, un espectro Raman es una representación de la intensidad de la luz dispersada frente al número de onda. El número de onda se relaciona con la longitud de onda a través de la siguiente expresión:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

Donde λ es la longitud de onda de la luz incidente. Suele ser común en espectroscopía emplear esta magnitud en cm^{-1} , c es la velocidad de la luz y ν la frecuencia de la luz dispersada por efecto Raman.

En lugar del número de ondas de la luz incidente es común representar en su lugar la diferencia del número de ondas entre la luz incidente y emitida. Esto es posible ya que la frecuencia de la luz incidente no modifica la posición de los picos en el espectro, aunque la intensidad de la luz dispersada si depende tanto de la intensidad como de la frecuencia de la luz incidente, además del tamaño de partícula, densidad de empaquetamiento (en sólidos) y posición de observación. Todo ello hace posible expresar la ecuación como:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu - \nu_0}{c}$$

Donde ν_0 es la frecuencia de la luz incidente y ν la frecuencia de la luz dispersada por efecto Raman.

Cabe destacar que, en general, la intensidad de las bandas Raman-Stokes es mucho mayor que las bandas Raman Anti-Stokes, debido simplemente a la distribución de Maxwell-Boltzmann, la mayoría de las moléculas se encontrarán en el estado de mínima energía, y no en uno excitado, por lo tanto, será más probable obtener frecuencias menores que la incidente. Cuantitativamente, se puede expresar con la siguiente ecuación:

$$\frac{N_i}{N_0} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}}$$

Donde N_i es el número de moléculas en el estado i (excitado), ΔE es la diferencia de energía entre los estados i (excitado) y 0 (fundamental), k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura [29].

Micro-espectrómetro RAMAN

La representación esquemática de un micro-espectrómetro Raman general se muestra en la Fig. 2.12. Tiene cuatro componentes principales: (1) una fuente de láser, (2) un microscopio, (3) un espectrómetro y (4) un detector. El láser es una fuente de luz monocromática y, en la actualidad, es la fuente más utilizada para los experimentos Raman [28].

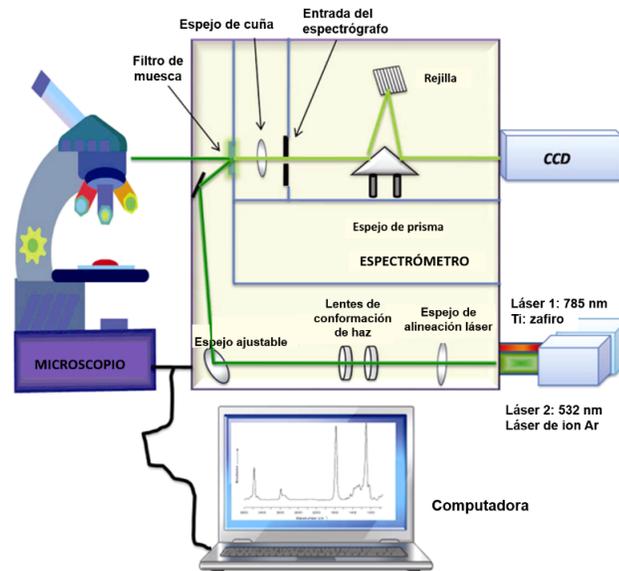


Figura 2.12: Diagrama de rayos del micro-espectrómetro Raman [28].

En general, el micro-espectrómetro Raman funciona con geometría de dispersión hacia atrás (180°), es decir, la iluminación de la muestra y la recolección de luz dispersada de la muestra se realizan con el mismo objetivo. El objetivo utilizado determina la resolución espacial, que depende de su apertura numérica (NA). En forma simplificada, la resolución espacial limitada por difracción se puede definir como:

$$R = \frac{\lambda}{2NA}$$

Donde $NA = \eta \sin \theta$, η es el índice de refracción del medio entre el objetivo y la muestra en estudio, θ la mitad del ángulo de cono máximo de la luz que puede entrar o salir de la lente y λ la longitud de onda incidente de luz.

El componente más importante de un espectrómetro es el elemento dispersivo (es decir, la rejilla) que decide la resolución espectral. La resolución espectral de un espectrómetro se define como la capacidad de distinguir entre características espectrales adyacentes en un espectro. A medida que aumenta el número de líneas por milímetro de una rejilla, aumenta el poder de resolución del espectrómetro. Por ejemplo, una rejilla con 1800

líneas/mm resolverá los componentes adyacentes en un espectro mejor que la rejilla con 1200 líneas/mm. Finalmente, la luz dispersada se enfoca en el dispositivo de carga acoplada (CCD), que se usa comúnmente para detectar señales Raman [28].

Uno de los aspectos más importantes para el uso de la espectroscopía Raman en diferentes campos de aplicación es la elección adecuada de la longitud de onda de excitación del láser. Para la espectroscopía Raman lineal analítica, se aplican principalmente láseres de onda continua con una longitud de onda fija. Una gran variedad de láseres que cubren un amplio rango desde el espectro visible se ha utilizado en las últimas décadas, pero, debido al rápido desarrollo de configuraciones sensibles de micro-Raman en la actualidad, los láseres de diodo rojo funcionan a 785, 810 o 830 nm, así como los láseres Nd: YAG (1064 nm) se han utilizado en la espectroscopía Raman [30].

La dispersión Raman estándar tiene una eficiencia muy baja. Una sección transversal típica para la dispersión Raman es aproximadamente de 11 órdenes y 8 órdenes de magnitud más pequeñas que las secciones transversales típicas para la absorción en las regiones ultravioleta e infrarroja, respectivamente. Por lo tanto, durante muchas décadas, la espectroscopía Raman no fue considerada una herramienta analítica útil. Por ejemplo, para registrar los espectros Raman convencionales, usualmente se requieren concentraciones analíticas mayores de 0.01 M. Sin embargo, la eficiencia de la dispersión de Raman puede incrementarse significativamente, lo que permite la observación de los espectros de Raman incluso para una sola molécula [31].

2.4.1 Dispersión Raman Amplificada por Superficie (SERS)

En 1977, Van Duyne et al. descubrieron el efecto SERS en electrodos de plata rugosos lo que fue un avance importante en la espectroscopía Raman. Inicialmente, en 1974, Fleischmann et al. observaron señales Raman enormemente mejoradas de moléculas de piridina adsorbidas en un electrodo de plata rugosas por un método electroquímico. Sin embargo, los autores atribuyeron las enormes señales de Raman al aumento en el

número de moléculas adsorbidas en la superficie corrugada de los electrodos con el área de superficie ampliada. No obstante, después de cuidadosos cálculos, Van Duyne reconoció que la señal Raman de las moléculas adsorbidas era $10^5 - 10^6$ veces más alta que la de la piridina en masa. Llegaron a la conclusión de que la señal de Raman anómalamente intensa no podía explicarse simplemente por el aumento de la cantidad de moléculas adsorbidas debido al área de superficie ampliada, y en su lugar, debería atribuirse al verdadero realce de la eficiencia de dispersión de Raman. Jeanmaire et al. y Albrecht et al. mostraron que una mejora en la señal Raman se debía a un campo electromagnético localizado alrededor de las nanoestructuras metálicas. Este efecto se conoció como Superficie Amplificada por Dispersión Raman (SERS) (ver Fig. 2.13 que muestra la diferencia entre espectroscopía Raman y técnica de SERS).

El descubrimiento de SERS provocó de inmediato un interés significativo porque la baja sensibilidad de detección ya no era un defecto fatal para la espectroscopía Raman superficial. Además, el SERS se puede utilizar para estudios in situ incluso en entornos electroquímicos/acuosos con sensibilidad ultra alta y excelente resolución espectral de manera no destructiva [32].

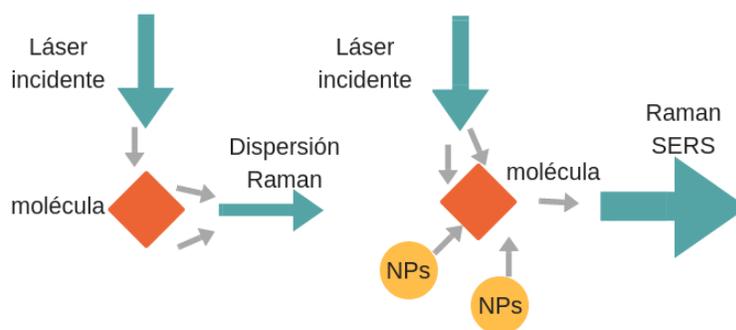


Figura 2.13: Esquema de la dispersión Raman vs dispersión SERS.

Los límites de detección son considerablemente más bajos (hasta 10^{-9} M) que los de la dispersión Raman de resonancia [30]. La teoría clásica de la dispersión de la luz

proporciona una comprensión cualitativa del proceso SERS. Se considera un haz de luz incidente que induce un dipolo de oscilación μ en una partícula que reaparece o dispersa la luz a la misma frecuencia de la oscilación del dipolo. Para el caso particular en el que la magnitud del campo eléctrico incidente (E) no es demasiado grande, el momento dipolar inducido se puede aproximar de la siguiente manera:

$$\mu = \alpha E$$

Donde α es la polarizabilidad de la molécula [30].

El SERS es una poderosa herramienta analítica, y ha atraído una gran atención en diferentes campos, como la ciencia de los materiales, la biomedicina, el análisis y la detección de moléculas, debido a su alta sensibilidad, a la adquisición precisa de información de huellas digitales y a la propiedad de detección no invasiva. El SERS se puede usar para identificar y cuantificar analitos de moléculas, incluso a nivel de una sola molécula [33]. Durante la última década, el campo SERS ha sido testigo de muchos logros, incluido un estudio teórico de SERS, el desarrollo de espectrómetros Raman portátiles y de alto rendimiento y la fabricación de sustratos SERS altamente sensibles, uniformes y reproducibles. Estos importantes estudios proporcionan la base para muchas aplicaciones SERS [34].

Mecanismo de mejoramiento: electromagnético y químico

Existen dos tipos principales de contribuciones a la mejora total de la señal SERS de las moléculas adsorbidas: una mejora electromagnética a veces denominada el efecto eléctrico en el cual la molécula experimenta grandes campos locales causados por resonancias electromagnéticas cerca de la superficie de estructuras metálicas, y un efecto químico o de transferencia de carga también conocido como el efecto molecular en el que la polarizabilidad molecular es afectada por la interacción entre la molécula y la superficie del metal.

Mecanismo electromagnético

La mejora electromagnética se basa en dos mejoras principales. El primero es la mejora del campo electromagnético incidente del láser debido a la adición del campo provocado por la polarización de las partículas metálicas. La segunda se debe a que la molécula irradia un campo electromagnético amplificado, que polariza aún más la partícula de metal y de esta manera actúa como una antena para amplificar aún más la señal Raman [30].

El mecanismo electromagnético del SERS se basa en un fenómeno conocido como el plasmón de resonancia superficial localizado (LSPR). El LSPR es la oscilación colectiva de los electrones de conducción de superficie de las nanopartículas plasmónicas de metales nobles que tienen un tamaño más pequeño en comparación con la longitud de onda de la luz entrante. En la Fig. 2.14 se muestra un diagrama físicamente intuitivo del LSPR.

El LSPR crea regiones de intenso campo EM alrededor de una superficie de nanopartículas o una unión de la punta de la muestra, conocidas como puntos calientes, que pueden producir factores de mejoramiento de la señal de entre 10^5 a 10^{10} [35]. Y en general se considera que es independiente de la naturaleza de la molécula y, en general, es responsable de la mejora del SERS [36].

Mecanismo químico o de transferencia de carga

La contribución química en contraste surge de la adsorción de la molécula en la superficie del metal, donde la transferencia de carga y los eventos resonantes dentro de la propia molécula adsorbida juegan un papel fundamental [36]. En el mecanismo químico, se ha modelado teóricamente que las moléculas adsorbidas en ciertos sitios de superficie (como grupos atómicos) que se acoplan electrónicamente con la superficie, lo que lleva a un efecto de mejora similar al de la dispersión de Raman por resonancia [37].

Se han llevado a cabo numerosos estudios para dilucidar la existencia del mecanismo de transferencia de carga. Algunos investigadores lo utilizan para explicar porque el factor

de mejora de la primera capa de adsorbato es mucho mayor que el de las capas posteriores. Básicamente, la mejora experimentada a partir de la transferencia de carga se produce cuando las moléculas fisisorben o forman un quimio-adsorbendor directamente sobre la superficie rugosa, formando un complejo de adsorbato-metal. Si se produce quimisorción, los orbitales moleculares del adsorbato se amplían mediante una interacción con las bandas de conducción de la superficie del metal. Esto da como resultado una transferencia de electrones y una excitación del metal al adsorbato y viceversa. Como consecuencia, los espectros SERS de las moléculas sometidas al mecanismo químico son significativamente diferentes del espectro Raman de las especies libres, aunque los de las especies fisisorbidas no se cambian. El mecanismo de transferencia de carga está restringido por su naturaleza a moléculas directamente adsorbidas en el metal, en oposición al efecto electromagnético de campo cercano, que se extiende una cierta distancia más allá de la superficie. Por lo tanto, efectivamente opera solo en las primeras capas de adsorbatos.

Plasmones de resonancia

Plasmónica es la ciencia para estudiar las interacciones de la materia ligera en estructuras metálicas de tamaño nanométrico. El componente principal de la plasmónica es la nanoestructura metálica, que enfoca y guía la luz hasta una distancia nanométrica, lo que resulta en un fuerte acoplamiento entre los fotones incidentes y las oscilaciones colectivas de electrones libres en la superficie del metal [38].

La capacidad de una partícula metálica para aumentar la fuerza local de un campo EM se basa en sus propiedades plasmónicas. Los plasmones son la oscilación colectiva de electrones libres de un metal que, bajo excitación a ciertas frecuencias, resuenan en el campo óptico incidente. Estas oscilaciones pueden ocurrir por polaritones de plasmón superficial (SPP) para superficies macroscópicas o plasmones de resonancia superficial localizados (LSPR) para nanoestructuras.

Los LSPR concentran los campos localmente alrededor de una nanopartícula metálica.

La nube de electrones de la partícula se mueve hacia adelante y hacia atrás con la polaridad oscilante del campo incidente, que se opone a la fuerza restauradora de la atracción Coulómbica entre los electrones cargados negativamente y los núcleos positivos. Este proceso lleva a la partícula a emitir su propio campo dipolo que mejora el campo electromagnético incidente. Las mejoras de campo se vuelven mayores cuando la radiación incidente está más cerca de la frecuencia del LSPR que depende de las propiedades ópticas de la nanopartícula y sus alrededores [37].

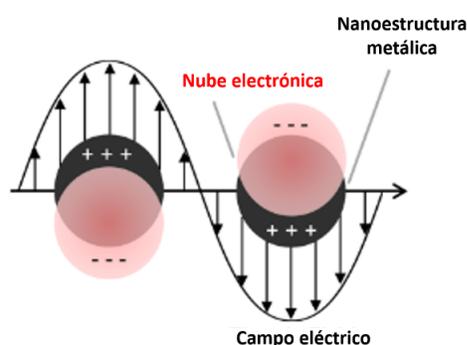


Figura 2.14: Dibujo esquemático de un plasmón de resonancia superficial localizado [35].

El SERS sirve como una técnica de identificación ultra sensible que funciona para la detección de una sola molécula y ha mostrado aplicaciones prometedoras en la detección biológica y química [39].

Sustratos SERS

Un sustrato SERS de buena calidad debe proporcionar un alto factor de mejora de SERS, debe ser uniforme, así como demostrar una alta estabilidad química. La alta reproducibilidad del factor de mejora de SERS y la gran estabilidad temporal de los sustratos de SERS son particularmente importantes para el análisis cuantitativo del material muestreado [31].

La mejora de la superficie se observa a partir de un número limitado de metales rugosos,

por ejemplo, plata, oro, cobre, aluminio, litio y sodio. La intensidad de la dispersión de los analitos adsorbidos ya no es proporcional a la frecuencia a la cuarta potencia (ν^4), como en el caso del proceso Raman convencional; de hecho, la intensidad de las bandas está relacionada con la frecuencia de la resonancia del plasmón superficial y la frecuencia de excitación del láser. La dependencia exacta está relacionada con la naturaleza del sustrato metálico, en particular con la identidad del metal y su rugosidad. Desde la primera observación de SERS, se han desarrollado numerosos sustratos activos de SERS. Se han empleado varios electrodos de metal diferentes para SERS, pero se observó el mayor realce de la superficie de los que están hechos de plata [30].

Las nanopartículas para sustratos SERS pueden prepararse con el mismo tamaño de partícula, recubrimiento de superficie y propiedades farmacocinéticas in vivo casi idénticas [37]. Las suspensiones coloidales son atractivas como sustratos SERS, ya que la agregación de partículas metálicas conduce a la formación de agregados con la rugosidad y la morfología fractal necesaria para generar espectros Raman intensos y pueden prepararse con una alta reproducibilidad. Además, son relativamente baratos. Debido a que se dispone de una superficie coloidal nueva y reproducible para cada análisis, es posible un análisis SERS confiable [30].

Moskovits interpretó el origen del SERS a las resonancias de plasmones de bultos de metal en la superficie rugosa. Se encontró que solo unos pocos metales libres de electrones, principalmente metales del Grupo 1B (Cu, Ag y Au) y álcalis podrían generar resonancia conductora óptica en el rango espectral visible [32]. El éxito del SERS depende en gran medida de la interacción entre las moléculas adsorbidas y la superficie de las nanoestructuras plasmónicas, a menudo los sustratos SERS clásicos de Au, Ag o Cu. En general, Au y Ag se usan con mayor frecuencia como sustratos SERS porque son materiales estables al aire, mientras que el Cu es más reactivo. Los tres metales tienen plasmones de resonancia superficiales localizados que cubren la mayor parte del rango de longitud de onda visible e infrarrojo cercano, donde se producen la mayoría de las

mediciones Raman, lo que también las hace más cómodas de usar [40] (ver Fig. 2.15 para observar los rangos de longitud de onda de Cu, Au y Ag).

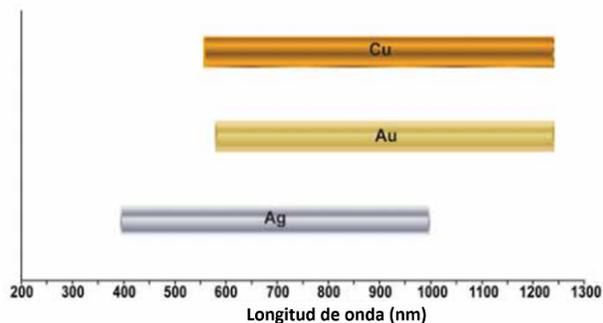


Figura 2.15: Rangos de longitud de onda aproximados donde Ag, Au y Cu se han caracterizado bien y se han establecido para soportar SERS [40].

Nanopartículas de plata (AgNPs)

La suspensión coloidal de plata de tamaño nanométrico son los sustratos SERS más comunes debido a su facilidad de preparación, larga vida útil y alto factor de realce de señal Raman que puede ser excitado desde la región espectral del ultravioleta (UV) al infrarrojo. Uno de los coloides de plata más utilizados se prepara con la reducción del nitrato de plata con citrato trisódico [41]. La reducción química del nitrato de plata con citrato produce una distribución más uniforme de los tamaños de partículas (24-30 nm) [30]. Las AgNPs de diferentes tamaños se pueden sintetizar fácilmente mediante este último método. Este proceso de preparación química da como resultado la formación de AgNPs con su superficie cubierta por una capa molecular de especies de citrato con carga negativa que se han utilizado ampliamente para detectar analitos con carga positiva, así como algunos iones con carga negativa [36].

Las AgNPs muestran una banda de absorción en la región UV-Vis que no está presente en el espectro del metal puro. Esta banda de absorción aparece cuando la frecuencia del fotón incidente está en resonancia con la oscilación colectiva de los electrones de conducción. Este fenómeno se manifiesta en la enorme amplificación del campo elec-

romagnético en la superficie de la nanopartícula metálica, provocando la amplificación de la señal Raman de las moléculas, adsorbidas en dicha superficie. La técnica SERS, por su alta capacidad de amplificar la señal Raman, tiene aplicaciones en el estudio de compuestos biológicos a concentraciones muy pequeñas, que puede ser hasta de una molécula aislada [42].

El desarrollo de nanopartículas diagnósticas y terapéuticas para aplicaciones biomédicas es de gran interés actual en la ciencia, la ingeniería y la medicina. La base fundamental es que las partículas de tamaño nanométrico tienen propiedades estructurales y funcionales que no están disponibles a partir de moléculas discretas o materiales a granel. En el rango de tamaño de 10 a 100 nm, las nanopartículas también tienen áreas de superficie más grandes para conjugar con múltiples agentes de diagnóstico (por ejemplo, óptico, radio isotópico o magnético) y terapéuticos (por ejemplo, contra el cáncer y contra la inflamación) [37].

Capítulo 3

Antecedentes

3.1 Ácido Siálico (AS)

Historia del AS

El 1957, Blix aisló una sustancia de la mucina de glándula submandibular por medio del método de hidrólisis, lo que produjo una reacción de color púrpura con el reactivo de Bial. Nombró la sustancia como ácido siálico. Luego, las personas obtuvieron AS cristalino perfecto de calostro (leche producida por las glándulas mamarias de los mamíferos) y nido de pájaro. Con el progreso de la evolución biológica, también aumentó la cantidad de AS in vivo, tales como peces, anfibios, reptiles, aves y otros vertebrados. En los mamíferos, el AS se distribuye principalmente sobre el líquido cefalorraquídeo y la mucosidad [43].

La determinación de la constitución del ácido neuramínico tomó mucho tiempo, debido a que sólo ocurre en la naturaleza en forma de derivados de acetilo, que también se denominan ácidos siálicos luego de una propuesta de Blix, Gottschalk y Klenk [44]. Sólo los grupos funcionales del ácido neuramínico, es decir, un grupo carboxilo, un grupo reductor (glucósido), un grupo amino y cinco grupos hidroxilo, se dieron a conocer rápidamente. Se arrojó más luz sobre la química del ácido neuramínico mediante las

primeras síntesis del ácido N-acetilneuramínico, que logró Cornforth et al. de la N-acetilglucosamina y el ácido oxalacético (“ácido pirúvico activado”) sobre la base de la suposición de Gottschalk de que el ácido N-acetilneuramínico es un condensado aldólico de la N-acetilglucosamina y ácido pirúvico.

En la todavía creciente familia de ácidos siálicos con más de 40 derivados diferentes de ácido neuramínico, el interés de la comunidad científica se dirige cada vez más hacia las especies O-acetiladas. En las últimas dos décadas, evolucionó el hecho de que los ácidos siálicos O-acetilados juegan un papel fundamental en el desarrollo de organismos, en la regulación del sistema inmunitario, en los procesos de cáncer y en muchos otros eventos biológicos y patofisiológicos [45].

Las células de animales superiores y diversos microorganismos producen ácido siálico en un largo camino a partir de la glucosa. Todos los mamíferos, incluidos los seres humanos, tienen la capacidad de sintetizar ácido siálico en todos los tejidos a partir de simples precursores de azúcar. El ácido siálico es un componente importante en todas las mucinas salivales. De hecho, el nombre de ácido siálico se deriva del griego “sialos”, que significa saliva. Recientemente, se demostró que los bebés prematuros alimentados con leche materna en los primeros 3 meses de vida tenían casi el doble de los niveles de ácido siálico unido en su saliva que los bebés prematuros alimentados con leche de fórmula [46].

Características del AS

Los ácidos siálicos son moléculas multifuncionales presentes en todos los tejidos y fluidos del cuerpo humano; las cantidades más altas se encuentran en la saliva humana [47]. La saliva es el primer fluido de defensa y un biomarcador salivar importante es el ácido siálico, es un marcador inflamatorio sistémico y un componente de glicolípidos salivares, glicoproteínas incluyendo inmunoglobulina A (IgA) y otras proteínas inmunológicas y de fase aguda [22].

El AS pertenece a una familia de ácido neuramínico (*ácido 5-amino-3,5-dideoxi-D-*

glicerol-D-galacto-nonulosónico). En esta familia hay 3 principales derivados de AS, los cuales son: *Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac)*, *hidroxialquilo de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Gc)* y *3-deoxi-D-glicerol-D-galacto-cetosa de nonilo (KDN)*. Los otros compuestos de AS se derivan además de estos. El AS se propaga ampliamente sobre la superficie celular de los mamíferos, donde la superficie de los glóbulos rojos y las células endoteliales están altamente sialiladas [43].

El término ácido siálico representa a una familia de 43 derivados naturales del ácido neuramínico monosacárido de nueve carbonos. El ácido *N-Acetilneuramínico (Neu5Ac)* es la forma más predominante del AS (ver Fig. 3.1 de la estructura del Neu5Ac) y casi la única forma encontrada en humanos. Un grupo N-Acetil y un grupo carboxilo confieren una carga negativa en la molécula bajo condiciones fisiológicas y la caracterizan como un ácido orgánico fuerte [41].

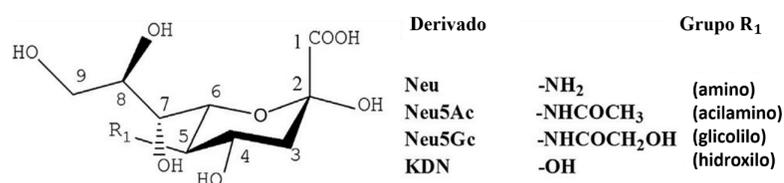


Figura 3.1: Estructura química del Neu5Ac [43].

Los ácidos siálicos están presentes en todos los vertebrados como componentes terminales de las cadenas oligosacáridos de mucinas, glicoproteínas y glicolípidos, se ha reconocido que están involucrados en la regulación de una gran variedad de fenómenos biológicos. En los seres humanos, se presentan en fluidos corporales (plasma sanguíneo, leche materna, saliva, líquido sinovial, sudor, excreción de vesícula biliar, jugos gástricos y orina) y en tejidos (eritrocitos, leucocitos, plaquetas, glándulas salivales, garganta, estómago, cuello uterino, cartílago, colón, etc.). Las concentraciones de AS en los fluidos corporales pueden reflejar el estatus metabólico y se reconoce como un marcador biológico para una variedad de procesos patofisiológicos [41].

El ácido siálico unido a las glicoproteínas de la membrana y los glicolípidos aparentemente entran en la circulación mediante el desprendimiento o la lisis celular. Aproximadamente del 98 al 99.5 % del total de ácido siálico en suero o plasma sanguíneo está unido a las glicoproteínas. Sólo una fracción muy pequeña de ácido siálico está unida a los lípidos, que se encuentra principalmente en forma de gangliósidos. Los niveles normales de ácido siálico total en suero sanguíneo están aproximadamente en el rango de 51 a 84 mg/dl. En contraste, la contribución de la fracción lipídica pura al nivel total de ácido siálico está apenas en el rango de 0.4 a 0.9 mg/dl [48].

Estudios en tipos de cáncer y periodontitis

El ácido siálico, es un derivado del ácido neuramínico y ha sido propuesto como marcador de respuesta inflamatoria en varios desórdenes sistémicos [49]. El proceso de glicosilación aberrante en células tumorales puede contribuir a la biosíntesis de las estructuras de carbohidratos de tal manera que las células malignas o transformadas contengan niveles de AS en la superficie. Se ha demostrado que la forma celular, el anclaje y la tasa de crecimiento influyen en el contenido de AS de la célula.

En algunos estudios, se ha detectado que el contenido total de ácido siálico aumenta en las células altamente metastásicas en comparación con las células no metastásicas. Sin embargo, en otros estudios no se ha encontrado un aumento constante en el ácido siálico celular total, pero se ha observado que las células altamente metastásicas tienen cantidades significativamente elevadas de neuraminidasa liberable de ácido siálico y también un mayor grado de sialilación de los grupos galactosa y N-acetilgalactosamina en comparación con las células no metastásicas [50].

La relevancia del ácido siálico para la célula tumoral es evidente a partir de la mayor actividad de sialilación y sialil-transferasa observada en muchas células cancerosas. La glicosilación aberrante encontrada en las membranas de las células cancerosas se debe presumiblemente a la activación de nuevas glicosil-transferasas que son características de las células tumorales y están ausentes o presentes sólo en pequeñas cantidades en

las células normales. Por lo tanto, se encuentra que una sialil-transferasa relativamente específica está presente hasta 2.5 a 11 veces en cantidades mayores en células tumorales cuando se compara con células control [48].

Se ha manifestado que el aumento del AS se correlaciona positivamente con la carga tumoral, es decir, el nivel de metástasis. Algunos hallazgos también sugieren que los niveles de AS podrían estar elevados en pacientes con cáncer antes de la aparición de síntomas clínicos. Además, varios informes han descrito la normalización de los niveles de AS después del tratamiento exitoso del cáncer, habiendo una elevación subsiguiente de los niveles de AS con reincidencia, lo que sugiere tentativamente que los niveles de AS podrían utilizarse, cuando se combinan con otros marcadores, en el seguimiento de respuesta al tratamiento. De hecho, diferentes mecanismos pueden subyacer a los niveles elevados de AS en el cáncer. Las células cancerosas se asocian con una mayor actividad de la sialil-transferasa, lo que lleva a un aumento de la cantidad de AS en la superficie celular, lo que aumenta la concentración de AS en plasma sanguíneo [51].

La concentración de ácido siálico sanguíneo ha sido demostrada clínicamente que incrementa cuando se asocia a enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide y neumonía, como también en tumores malignos [24]. Una neoplasia o cáncer a menudo tiene una mayor concentración de ácido siálico en la superficie de la célula tumoral, y algunas de estas células eliminan o secretan sialo-glicoproteínas o sialil-glicolípidos, lo que aumenta sus concentraciones en la sangre [52].

Se han observado mayores niveles de AS en suero sanguíneo en varios grupos de pacientes que padecen carcinoma de ovario avanzado, tumores cerebrales, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer cervicouterino, carcinoma de hipofaringe y laringe, cánceres rectales, intestinales grandes y bronco oncogénicos, derrame maligno, cáncer de boca, melanoma, estómago, mama, colorrectal, cáncer de vesícula biliar, cáncer de tiroides y de Hodgkin, sarcoma y cáncer de endometrio [51]. También se han reportado niveles elevados de ácido siálico en sueros sanguíneos de pacientes con diversas neoplasias malignas,

incluido el cáncer cervicouterino (ver Tabla 3.1) [53].

Tabla 3.1: Valores de concentración de ácido siálico en suero sanguíneo para los grupos de NICs y CaCu.

	Vivas et. al [52] 1992	Baskaran et. al [53] 2010
Grupos de estudio	Concentración media de AS total (mg/dl)	Concentración de AS total (mg/dl)
Control	75.5	45.83 ± 3.43
NIC 1	67.3	48.52 ± 4.26
NIC 3	79.1	52.16 ± 3.18
EC I	82.0	58.25 ± 4.12
EC III	87.7	65.76 ± 4.68
EC III	97.3	79.58 ± 6.36
EC IV	112.7	

El AS es un componente importante de las glicoproteínas salivares y mejora la agregación de bacterias y participa en la formación de película adquirida y placa dental [54]. Es generalmente aceptado que el medio ambiente oral es influenciado por la composición de la saliva, tal que afecta ambos el tejido oral y la flora. Recientemente ha habido incrementos en reportes que indican que el ácido siálico en sangre se incrementa cuando ocurre una inflamación (ver Tabla 3.2) [24].

Tabla 3.2: Valores de concentración de ácido siálico en suero sanguíneo para los grupos control, gingivitis y periodontitis.

	Rathod et. al [55] 2014
Grupos de estudio	Concentración media de AS total (mg/dl)
Control	49.75 ± 4.87
Gingivitis	65.65 ± 3.56
Periodontitis	75.98 ± 3.58

Se ha sugerido que la enzima neuraminidasa, responsable de la síntesis del ácido siálico (*ácido N-acetil neuramínico*), puede desempeñar un papel en la formación de placa y

en la enfermedad periodontal. La función del ácido siálico en las secreciones salivales siempre ha generado mucho interés debido a su posible relevancia para la salud oral, por lo que se ha encontrado que el monitoreo de la actividad del ácido siálico era importante para extender la descripción morfológica previa de las alteraciones en la estructura del tejido submandibular [56].

El AS está presente en varias proteínas de fase aguda que se sabe están asociadas con la periodontitis. Existe la necesidad de biomarcadores, para la detección temprana de la evolución de la enfermedad y para terapias más eficaces. Los niveles de ácido siálico se incrementan en periodontitis, debido a su constituyente protector de la mucina salival humana y la fracción de ácido siálico unido a lípidos se puede utilizar como parámetro de diagnóstico para periodontitis [22]. Pero hasta la fecha, hay muy pocos datos con respecto a la estimación y comparación simultáneas del contenido total de AS en saliva y suero sanguíneo de pacientes con periodontitis crónica [55].

3.2 Saliva

Historia de los diagnósticos basados en saliva

El campo de los diagnósticos de saliva surgió a principios de 1900, a través de la evaluación de Michael y Kirk de muestras de saliva para identificar biomarcadores para el reumatismo y la gota. Después de eso, Irwin Mandel, en 1967, informó sobre el aumento de las concentraciones de calcio en la saliva en pacientes con fibrosis quística, enfatizando la saliva como un importante fluido de diagnóstico.

Además, Oppenheim en 1970 identificó por primera vez los componentes séricos en la saliva. En las décadas siguientes, los diagnósticos basados en saliva aumentaron dramáticamente debido a los logros de los enfoques de alto rendimiento que ofrecen las innovaciones de espectrometría de masas y la bioinformática [18].

Composición de la saliva

La saliva es una secreción compleja proveniente de las glándulas salivales mayores en el 93 % de su volumen y de las menores en el 7 % restante, las cuales se extienden por todas las regiones de la boca excepto en la encía y en la porción anterior del paladar duro. La secreción diaria oscila entre 500 y 700 ml, con un volumen medio en la boca de 1.1 ml. Su producción está controlada por el sistema nervioso autónomo. El 99 % de la saliva es agua mientras que el 1 % restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas [57].

La saliva también contiene iones inorgánicos, como el bicarbonato y el fosfato, así como los aminoácidos y la urea. Las mucinas están presentes en >15 % del contenido de proteínas de la saliva. Los azúcares principales en estas mucinas son los siguientes ácidos: ácido neuramínico (ácido siálico), N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa y fucosa, y estos azúcares constituyen entre el 50 % y el 90 % del peso seco de la molécula [58].

La saliva total está compuesta principalmente de agua y otros componentes funcionales como proteínas, enzimas, electrolitos y moléculas orgánicas más pequeñas, como se describe en la Fig. 3.2 [18]:

COMPOSICIÓN DE LA SALIVA	
Proteínas: Enzimas Glicoproteína Péptidos	Albúmina; amilasa, β (beta) glucuronidasa, carbohidratos; cistatinas; factor de crecimiento epidérmico; esterases; fibronectina; gusten histatinas; inmunoglobulina A, G y M; kallikrein; lactato deshidrogenasa; lactoferrina; lipasa; lisozima; mucinas; factor de crecimiento nervioso; agreginas parotideas; peptidasas; fosfatasas, proteínas ricas en prolina; ribonucleasas; peroxidasas salivales; componente secretor; IgA secretora; proteínas séricas; proteínas ricas en tirosina; proteínas de unión a la vitamina
Moléculas orgánicas pequeñas	Creatinina, glucosa, lípidos, nitrógeno, ácido siálico , urea, ácido úrico
Electrolitos	Amoniaco, bicarbonato, calcio, cloruro, fluoruro, yoduro, magnesio, fosfatos, potasio, tampones no específicos, sodio, sulfatos, tiocianato.

Figura 3.2: La composición de la saliva.

El rol básico de la saliva es proteger y mantener la integridad de la parte superior de la membrana mucosa del tracto alimentario, facilitando funciones importantes [59]. Debido a la presencia de un gran número de bacterias que se desprenden continuamente de las superficies de los dientes y tejidos blandos, así como de las células epiteliales desprendidas, la saliva total generalmente requiere una centrifugación para proporcionar una muestra clara [60].

Saliva como fluido para el diagnóstico o tamizaje de enfermedades

La evolución de los diagnósticos salivales dentro de las últimas dos décadas anuncia un campo dinámico que ahora se incorpora como parte del diagnóstico de la enfermedad, el monitoreo clínico y la toma de decisiones clínicas importantes para el manejo del paciente y la atención general. Durante este lapso, se han registrado avances notables en las ciencias básicas y de traducción que emplean la “ciencia de la saliva”. La saliva es un “ultrafiltrado” de sangre y, como tal, actúa como un “espejo de la salud del cuerpo” y ofrece muchas ventajas únicas sobre otros fluidos corporales. La mayoría de los analitos, biomarcadores de enfermedades y medicamentos aparecen en la saliva a través de la difusión pasiva y otros mecanismos [18].

La saliva se ha propuesto como un medio alternativo al plasma sanguíneo en el monitoreo de biomarcadores que pueden ser útiles en el diagnóstico de varias enfermedades humanas, así como un elemento para monitorear la etiología de algunas patologías o efectos de las dosis de medicamentos. La simplicidad y la manera no invasiva de su recolección, la correlación positiva existente entre las múltiples sustancias presentes en el suero y la saliva, son algunas de las ventajas que ofrece este fluido como instrumento de diagnóstico para algunas enfermedades humanas [61].

El amplio espectro de compuestos presentes en la saliva puede proporcionar información para aplicaciones de diagnóstico clínico. La saliva es un buen medio porque su recolección no es invasiva y el proceso de donación es relativamente libre de estrés, por lo que se pueden realizar múltiples recolecciones sin imponer demasiada incomodidad

al donante. La saliva es fácil de recolectar, almacenar y transportar; no requiere personal altamente capacitado; y es más seguro que el personal del hospital lo maneje en comparación con la sangre y otros fluidos. Además, la saliva es un fluido “en tiempo real” porque las glándulas salivales son glándulas exocrinas que producen perfiles de proteínas indicativos del estado de salud y bienestar de un individuo en el momento de la recolección.

Existe un riesgo mínimo de contraer infecciones durante la recolección de saliva, y la saliva se puede usar en situaciones clínicamente difíciles, como obtener muestras de niños o pacientes discapacitados o ansiosos, en los que la toma de muestras de sangre podría ser un acto difícil de realizar [59]. Además, las muestras de saliva no son infecciosas y pueden desecharse fácilmente con un costo mínimo o la necesidad de contener los desechos de riesgo biológico durante el transporte. Cuando se requiere, el transporte de muestras también es significativamente más barato, y la saliva también elimina ciertos “tabúes” culturales asociados con la recolección de sangre que prevalece en ciertas culturas internacionales [18].

Hay mucha información útil sobre el cambio de componentes en la saliva cuando una persona está enferma. Por lo tanto, definimos estos componentes cambiantes como “biomarcadores”. La utilización de biomarcadores como predictores tempranos de la enfermedad clínica no solo contribuye a la prevención y el tratamiento eficaces de las enfermedades, sino que también mejora la evaluación de los riesgos potenciales para la salud. La razón por la cual la saliva se puede usar potencialmente como una muestra para el diagnóstico es su intercambio con sustancias existentes en el suero humano.

Una de las principales ventajas de usar la saliva como medio de diagnóstico es que su muestreo es fácil y no invasivo, eliminando así cualquier malestar y dolor asociado con la extracción de sangre y evitando los problemas de privacidad asociados con la recolección de orina. Además, en comparación con la sangre, la saliva contiene una cantidad menor de proteínas, lo que disminuye el riesgo potencial de interferencia no específica

e interacciones hidrostáticas. Dentro de la sangre, la concentración de proteínas puede variar en varios órdenes de magnitud, con vidas medias de proteínas que van desde unos pocos segundos hasta varios meses o más [62].

El marcado contraste con el proceso “invasivo” de recolección de sangre/suero de los pacientes contra el proceso no invasivo de recolección de saliva es casi absoluto. Por ejemplo, los pacientes que tienen fobia a los pinchazos con agujas que invariablemente participan para la extracción de sangre accederán fácilmente a los procedimientos más amigables para la recolección de saliva, que está en gran parte libre de maniobras amenazadoras y también es compatible con una cita médica sin estrés. Además, el hecho de que, a diferencia de la sangre, la saliva carece de capacidad de coagulación simplifica los pasos de preservación y hace que sea más fácil de manejar.

Las ventajas de la saliva como herramienta clínica sobre el suero son: los procedimientos no invasivos involucrados en la obtención de la muestra, un requisito de muestra más pequeño (alícuota), buena psicología y cooperación con el paciente, relación costo-efectividad en relación con la tecnología requerida, facilidad de almacenamiento y transporte, mayor sensibilidad y correlación del análisis de resultados que con el del suero sanguíneo [18].

Estudios en tipos de cáncer y periodontitis

La saliva es uno de los biofluidos que son accesibles, informativos y no invasivos, y los contenidos de algunas especies en saliva podrían utilizarse como indicadores para el diagnóstico de condiciones fisiológicas y biológicas, por lo tanto es ideal para los diagnósticos de enfermedades primarias que involucran enfermedades cardiovasculares, de tipo renal y enfermedades autoinmunes, particularmente para los tipos de cáncer (ver Tabla 3.3) [63].

Tabla 3.3: Valores de concentración de ácido siálico en saliva en grupos: control, neoplasias malignas del útero, cérvix y ovario; y neoplasias malignas de pulmón.

Bel'skaya et. al [47] 2018	
Grupos de estudio	Concentración de AS total (mg/dl)
Control	7.546 ± 0.711
Neoplasias malignas del útero, cérvix y ovario	5.226 ± 0.927
Neoplasias malignas de pulmón	4.577 ± 0.092

La saliva podría usarse como un fluido de diagnóstico no invasivo para medir los biomarcadores liberados durante el inicio y progresión de la enfermedad, como las infecciones periodontales [64]. La saliva es un líquido que se puede recolectar fácilmente, contiene marcadores derivados local y sistemáticamente de la enfermedad periodontal y, por lo tanto, puede ofrecer la base para una prueba diagnóstica específica del paciente para la periodontitis (ver Tabla 3.4) [65].

Tabla 3.4: Valores de concentración de ácido siálico en saliva en grupos: control, gingivitis y periodontitis.

	Emekli-Alturfan et al. [54] 2013	Jawzali et al. [66] 2016	Rathod et al. [55] 2014
Grupos de estudio	Concentración de AS total (mg/dl)	Concentración de AS total (mg/dl)	Concentración de AS total (mg/dl)
Control	2.89 ± 0.3	77.5	39.05 ± 6.35
Gingivitis	-	97.0	68.23 ± 2.71
Periodontitis	6.95 ± 0.28	152.1	81.33 ± 3.94

Futuro del diagnóstico por medio de saliva

El análisis de saliva podría ser en un futuro una herramienta eficiente, no invasiva y amigable con el paciente para el diagnóstico de cáncer. La capacidad para diagnosticar está basada en el contacto permanente e íntimo entre la saliva y la mucosa donde el cáncer evoluciona. Los pacientes con esta afectación tienen una alteración global de la composición salival. Los niveles salivares de azúcar total, ácido siálico enlazado a proteínas, ácido siálico libre, sodio, calcio, inmunoglobulina G, albúmina y lactato deshidrogenasa son significativamente mayores comparados con los controles de mucosa saludable [67].

El enfoque en el AS como un marcador tumoral se debe examinar desde la perspectiva de la glicosilación aberrante en las membranas de las células cancerosas debido a la activación de nuevas glicosil-transferasas que son características de las células tumorales [48]. La determinación de AS podría ser una valiosa herramienta para monitorear la progresión o regresión de una enfermedad durante la terapia, especialmente cuando se combina con otros marcadores. Varios estudios sugieren que los niveles de AS podrían usarse en el monitoreo de la respuesta al tratamiento y la recaída cuando se combinan con otros marcadores. Será importante evaluar si la razón de los niveles elevados de AS aumenta o disminuye la sialilación de proteínas y/o lípidos, para comprender mejor los mecanismos biomédicos del AS en diferentes enfermedades. El desafío interesante para el futuro es el desarrollo de técnicas de ensayo más específicas que sean fáciles de usar, que puedan conducir a la medición de componentes individuales de AS, lo que posiblemente lleve a la utilidad clínica de AS como biomarcador único [51].

Sería conveniente tener disponible un marcador sensible y específico para el cáncer cervicouterino para complementar la declaración clínica y evaluar el efecto terapéutico. Los estudios de células malignas han revelado alteraciones en las superficies celulares y membranas en términos de ácido siálico en el contenido de glicoproteínas y glicolípidos [52].

El futuro de los diagnósticos de saliva se basa en combinaciones de varios biomarcadores utilizados como herramientas de detección para mejorar la precisión y especificidad del diagnóstico. Un biomarcador solo puede no ser una fuente confiable para que los investigadores puedan definir la patogenia de la enfermedad subyacente. El uso de combinaciones de biomarcadores puede proporcionar información diagnóstica aditiva y potente.

Al considerar el desarrollo de una nueva prueba de diagnóstico, su utilidad se verá influenciada por la precisión, la rentabilidad y la facilidad de uso. Las pruebas de diagnóstico de saliva tienen el potencial de ser utilizadas dentro de un amplio espectro de

aplicaciones que incluyen programas de detección basados en la población, diagnóstico confirmatorio, estratificación del riesgo, determinación del pronóstico y monitoreo de respuesta a la terapia. La detección de una población completa para un cierto tipo de enfermedad será posible en un futuro próximo mediante el uso de diagnósticos de saliva. Cuando se utiliza la saliva como fluido de diagnóstico, es importante reducir el número de resultados de pruebas con falsos negativos y falsos positivos, ya que estos tendrán efectos perjudiciales en el diagnóstico y la terapia del paciente [59].

Capítulo 4

Metas y Objetivos

4.1 Hipótesis

Existen diferencias en los niveles de ácido siálico salival en:

1. Pacientes con diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor comparado con pacientes con lesiones precancerosas.
2. Pacientes con diagnóstico de enfermedad periodontal comparado con pacientes con gingivitis y sanos.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivos Generales

Determinar si existe una diferencia en la concentración del ácido siálico en saliva entre:

1. Mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino invasor contra lesiones precancerosas.
2. Mujeres diagnosticadas con periodontitis contra gingivitis y sanas.

4.2.2 Objetivos Específicos

Determinar y comparar la concentración de ácido siálico en saliva en:

1. Mujeres con cáncer cervicouterino invasor y en mujeres con lesiones precancerosas.
2. Mujeres con periodontitis contra gingivitis y sanas.

4.2.3 Objetivos Secundarios

Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del ácido siálico para evaluar la presencia o ausencia de cáncer cervicouterino invasor o periodontitis, así como obtener el mejor punto de corte de los niveles de ácido siálico.

4.3 Pregunta de Investigación

¿Será la concentración de ácido siálico mayor en pacientes con (1) cáncer cervicouterino invasor que en pacientes con lesiones precancerosas y (2) en pacientes con periodontitis que en pacientes con gingivitis y sanas?

Capítulo 5

Estudio, Población y Muestra

5.1 Tipo de Estudio

El tipo de estudio que se llevará a cabo será:

- Estudio piloto para los grupos de estudio: CaCu y NICs.
- Estudio transversal para los grupos de estudio: sano (control), gingivitis y periodontitis.

Un **estudio piloto** puede definirse como un “estudio pequeño para probar protocolos, instrumentos de recolección de datos, estrategias de reclutamiento de muestras y otras técnicas de investigación en preparación para un estudio más amplio.” Un estudio piloto es una de las etapas importantes en un proyecto de investigación y se realiza para identificar problemas potenciales y deficiencias en los instrumentos y el protocolo de investigación antes de la implementación durante el estudio completo [68].

El **estudio transversal** también es conocido como encuesta de frecuencia o estudio de prevalencia. En general, se realiza para examinar la presencia o ausencia de una enfermedad u otro resultado de interés, en relación con la presencia o ausencia de una

exposición, ambos hechos ocurriendo en un tiempo determinado y en una población específica [69].

5.2 Población y Muestra

Población de los grupos de estudio: cáncer cervicouterino invasor y lesiones precancerosas

Lugares de realización:

- Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” por la División de Ginecología y Obstetricia, Servicio de Ginecología y Servicio de Displasias. Se ubica en: Av. Venustiano Carranza no. 2395 C.P. 78290 San Luis Potosí, S.L.P., México.
- Hospital General de Ciudad Valles por la clínica de Colposcopía. Se ubica en: Carretera México-Laredo km 7 Esq. Ángel Oliva, Fracc. Oxitipa C.P. 79090 Ciudad Valles, San Luis Potosí, S.L.P., México.
- CIACYT-UASLP (Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología) en el área de CARIEM (Centro de Aplicación de la Radiación Infrarroja, Energías Alternativas y Materiales) en el Laboratorio de Nanotecnología Aplicada. Se ubica en: Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2a. Sección, C.P. 78210 San Luis Potosí, S.L.P., México.

Muestra

Universo de estudio:

- Pacientes del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, que acuden con diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor y lesiones precancerosas.

- Pacientes de la clínica de displasias del Hospital General de Ciudad Valles, que acuden con diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor y lesiones precancerosas.

Criterios de selección:

- Inclusión:
 - Sin tratamiento previo: Cuando un paciente no ha recibido ningún tratamiento previo, como ejemplo: quimioterapia, radioterapia, etc.
 - Todos los estadios clínicos: 0, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA y IVB.
 - Pacientes con estudio histopatológico con patología benigna (NIC1, NIC2/3) o cáncer cervicouterino invasor.
- Exclusión:
 - Segunda neoplasia primaria.

Cuadros de variables para los grupos de estudio: NICs y CaCu

Dependiente**				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Concentración de ácido siálico	Cantidad de ácido siálico en la saliva	0-200	mg/dl	Continua
Independiente***				
Tipo histológico	Tipo histológico determinado por patología en biopsia de tumor.	1.- Lesiones precancerosas (NIC1, NIC 2/3) 2.- Cáncer cervicouterino invasor	-	Catagórica (2 categorías)

Figura 5.1: Cuadro de variables para los grupos de estudio: NICs y CaCu.

****Variable dependiente:** Es el factor que el investigador observa o mide para determinar el efecto de la variable independiente o variable causa. Es la variable respuesta o

variable salida. En términos comportamentales, esta variable es el comportamiento resultante de un organismo que ha sido estimulado. Es el factor que aparece, desaparece, varía, etc., como consecuencia de la manipulación que el investigador hace de la variable independiente.

*****Variable independiente:** Es la variable que el investigador mide, manipula o selecciona para determinar su relación con fenómenos observados. Esta variable es conocida también como variable estímulo. Puede tener su origen en el sujeto o en el entorno del sujeto. Es la variable que el investigador manipula para ver los efectos que produce en otra variable [70].

Población de los grupos de estudio: sano (control), gingivitis y periodontitis

Lugares de realización:

- Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). Se ubica en: Av. Dr. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria, C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P., México.
- CIACYT-UASLP (Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología) en el área de CARIEM (Centro de Aplicación de la Radiación Infrarroja, Energías Alternativas y Materiales) en el Laboratorio de Nanotecnología Aplicada. Se ubica en: Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2a. Sección, C.P. 78210 San Luis Potosí, S.L.P., México.

Muestra

Universo de estudio:

- Pacientes de la clínica de periodoncia de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Criterios de selección:

- Inclusión:
 - Pacientes de género femenino de 30 a 60 años, sin enfermedades sistémicas, con o sin gingivitis, con o sin periodontitis y que aceptaron participar en el estudio.

- Exclusión:
 - Pacientes con terapia antibiótica en los tres meses anteriores, con tratamiento previo de enfermedad periodontal, consumo de antiinflamatorios y corticosteroides en los tres meses anteriores, embarazadas y lactantes, fumadores, pacientes con patologías genéticas evidentes y pacientes edéntulos.

Cuadro de variables para los grupos de estudio: sano, gingivitis y periodontitis

Dependiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Concentración de ácido siálico	Cantidad de ácido siálico en la saliva	0-200	mg/dl	Continua
Independiente				
Profundidad del surco gingival	Determinado por un especialista odontológico mediante una sonda	1.- Control (sano) 2.- Gingivitis 3.- Periodontitis	-	Categórica (3 categorías)

Figura 5.2: Cuadro de variables para los grupos de estudio: sano, gingivitis y periodontitis.

5.3 Plan de Trabajo

Planteamiento del proyecto con los pacientes: Se invitó a participar a todas las pacientes de la consulta externa de Ginecología (caso del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”) y consulta de la clínica de Colposcopia (caso del Hospital General de Ciudad Valles) que tengan diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor y lesiones

precancerosas. Así como también a los pacientes de la consulta de Periodoncia de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Se les explica las generalidades del proyecto tanto como el señalamiento de que es una investigación de bajo riesgo y que en caso de no querer participar o no continuar en la investigación podrán abandonar en cualquier momento el estudio.

A las pacientes que acepten, firmarán el consentimiento informado, se les explica el tipo de muestras que se requieren, que información se obtendrá de ellas y la interpretación de resultados que recibirán al finalizar el estudio. Como también les solicitamos su autorización para poder revisar su expediente clínico y recabar información necesaria en un cuestionario para completar esta investigación, como la edad, peso, padecimiento de alguna enfermedad, toma de medicamentos, si fuma o consume otro tipo de drogas, los datos referentes a los estudios que se le han realizado, los análisis de laboratorio y/o las cirugías que se le harán de ser necesario, como parte de su diagnóstico y tratamiento.

Recolección de la muestra: Se requiere de un proceso de higiene bucal el cual consta de un cepillado de dientes, seguido de un enjuague bucal, para lo cual se proporcionará un cepillo, pasta y enjuague bucal sin ningún costo para cada paciente. El uso de los productos para el aseo bucal no afecta los componentes de la muestra de saliva, sólo ayuda a una eliminación de restos de comida. Posterior a la limpieza se proporcionará un vial de plástico, estéril y etiquetado en el cual la paciente depositará la cantidad de 0.5 hasta 1.5 ml de saliva. Posterior a la recolección, se transportará a temperatura ambiente y finalmente se mantendrá la muestra en refrigeración a 4°C hasta que se realice la medición de ácido siálico y podrá almacenarse hasta 1 mes a partir de la recolección.

Procesamiento de la muestra: Se transportará en una hielera, manteniendo la temperatura previamente descrita, al CIACYT-UASLP donde se centrifugará a 6000 rpm (revoluciones por minuto) y posteriormente se obtendrá el sobrenadante de la muestra, una vez obtenido el sobrenadante pasará a mezclarse con nanopartículas de plata (estas nanopartículas a su vez pasarán por un baño ultrasónico para asegurar que la solución

sea homogénea y las partículas tengan una adecuada dispersión).

Medición del ácido siálico: Se mide el ácido siálico comercial con partículas de plata en diversas concentraciones en mg/dl para calibrar la medición. Posteriormente se realiza la medición de las muestras obtenidas. Se obtiene una señal Raman que se interpreta y compara mediante el programa OriginPro obteniendo las concentraciones de cada muestra.

Los resultados obtenidos serán entregados de manera personal en sobre cerrado y respetando la confidencialidad de cada participante.

5.4 Aspectos Éticos

El presente protocolo se sometió y aprobó por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” y por el Comité de Ética e Investigación para la Salud del Hospital General de Ciudad Valles, como también por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí para el caso de la Facultad de Estomatología.

El cuestionario y la toma de muestra que se realizaron se consideran de riesgo menor por lo que no transgreden las normas de la conferencia de Helsinki de 1964 y su revisión de 2013.

Se obtuvo el consentimiento de los pacientes por escrito a través de un documento en donde se especifica el objetivo del estudio, los métodos y las técnicas utilizadas. A cada una de las pacientes se les explica en qué consiste el estudio y las encuestas utilizadas, dejándoles claro que el que participen o no es voluntario y no influye en el manejo de su enfermedad. Posteriormente, se les pide que lean el consentimiento informado y una vez que hayan resuelto cualquier duda al respecto se les pide que firmen el documento. Se asegura la confidencialidad de los datos obtenidos.

Debido a que se realizan estudios en humanos, este estudio se apegó a lo que se conside-

ra y concierne a la Ley General de Salud de México en cuyo título noveno en el capítulo de “Derechos y Obligaciones de los beneficiarios” en el Artículo 77 bis 37 en el apartado IX, se señala que: “Otorgar o no su consentimiento válidamente informado y a rechazar tratamientos y procedimientos”, en el título quinto capítulo único, “Investigación para la salud” en el artículo 100, referente a la investigación en seres humanos, en los apartados III y IV, se señala que “podrá efectuarse solo cuando exista una razonable seguridad de que no expone a riesgos ni daños innecesarios al sujeto en experimentación” y que “se deberá contar con el consentimiento por escrito del sujeto en quien se realizará la investigación, o de su representante legal en caso de incapacidad legal de él mismo, una vez enterado de los objetivos de la experimentación y de las posibles consecuencias positivas o negativas para su salud” [71].

Lo anterior coincide con lo dispuesto en la Ley de Salud del Estado de San Luis Potosí, en el artículo 84, fracciones III “Podrá efectuarse solo cuando exista una razonable seguridad de que no expone a riesgos, ni daños innecesarios al sujeto en experimentación” [72].

La carta de consentimiento informado fue diseñada conforme a los lineamientos establecidos en la siguiente normatividad:

1. Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012. Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos [73].
2. Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-1994. Para la prevención y control de enfermedades bucales, en título siete “Prevención de enfermedades bucales” en el apartado 7.3.2.6 que señala que “todos los desechos punzocortantes, potencialmente contaminados con sangre o saliva deben colocarse en recipientes desechables, rígidos, de propileno resistente a fracturas y pérdida de contenidos al caerse” [74].

Capítulo 6

Materiales y Metodología

6.1 Materiales y Equipo

Materiales Nitrato de plata ($AgNO_3$, 99.99 %) y citrato trisódico dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) de la marca Sigma Aldrich. Se utilizó agua desionizada. La solución de citrato trisódico utilizada en la síntesis fue preparada justo antes de utilizarse.

Equipo

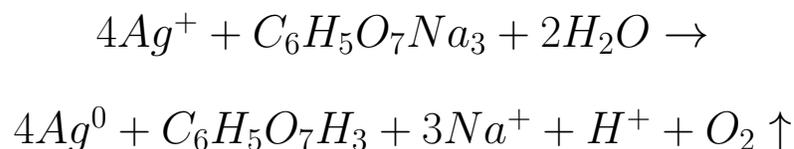
- Equipo Zetasizer Nano marca Malvern Panalytical modelo ZS90 empleando las celdas S90/ZS90 y DTS1070.
- Espectrómetro USB-650 Red Tide modelo USB-650-UV-VIS con el uso del software Ocean Optics SpectraSuite y la celda Ultra micro-cell.
- Microscopio Electrónico de Barrido SEM marca FEI modelo Inspect 150.
- Espectrómetro Raman Horiba Jobin Yvon XploRA ONE acoplado a un microscopio óptico Olympus BX4.
- Bomba de vacío.
- Vortex Genie 2 marca Scientific Industries.

- Centrífuga DMA0412 marca DIAB.
- Mini centrífuga marca Thomas Scientific.

6.2 Metodología Parte I: Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Plata

6.2.1 Síntesis de Nanopartículas de Plata (AgNPs)

Empleando el método de Turkevich [75] se prepararon 10 ml de nitrato de plata ($AgNO_3$) en solución acuosa a 2.5 mM en un vial de vidrio. La reacción se llevó a cabo inicialmente a temperatura ambiente y a constante agitación utilizando una barra magnética. Posteriormente fue calentada a 95°C y justo cuando se presentó el punto de ebullición se agregó 10 ml de citrato trisódico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) en solución a 2.5mM. Se tuvo un control de la temperatura utilizando un termopar [76]. El mecanismo de reacción puede ser expresado como sigue:



El color de la solución de reacción cambió de incoloro pasando por amarillo y terminando en un color grisáceo que indica la presencia de nanopartículas de plata. La solución de partículas obtenida fue filtrada empleando papel Whatman no. 1 de 42.5 mm y bomba de vacío. Finalmente, las partículas filtradas se lavaron utilizando un volumen de 10 ml y se centrifugaron por 3 minutos a 4500 rpm en centrífuga DMA0412 marca DIAB. Después se retiró el sobrenadante y se agregó agua desionizada para centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones (ver Fig. 6.1).



Figura 6.1: Nanopartículas de plata.

6.2.2 Caracterización de Nanopartículas de Plata (AgNPs)

6.2.2.1 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La dispersión dinámica de la luz es una técnica para medir el tamaño de las partículas típicamente en la subregión micro. El equipo DLS mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de partículas debido al bombardeo de las moléculas de disolvente que las rodean. Normalmente DLS se ocupa de la medición de partículas suspendidas dentro de un líquido.

Cuanto más grande sea la partícula, más lento será el movimiento browniano. Las partículas más pequeñas son “expulsadas” por las moléculas del disolvente y se mueven más rápidamente. Y para DLS es necesaria una temperatura conocida con precisión, ya que se requiere el conocimiento de la viscosidad (porque la viscosidad de un líquido está relacionada con su temperatura).

El tamaño de una partícula se calcula a partir del coeficiente de difusión traslacional mediante el uso de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Donde: $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión traslacional, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η es la viscosidad. Se

debe hacer mención que el diámetro medido en DLS es el valor referido a como una partícula se difunde dentro de un fluido que es referido como diámetro hidrodinámico. El diámetro que es obtenido por esta técnica es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión translacional que la partícula [77].

Las AgNPs fueron caracterizadas por medio de un equipo DLS Zetasizer Nano marca Malvern Panalytical modelo ZS90 con las siguientes características: temperatura a 25°C, láser estándar de 633 nm y a 4mW de potencia para medir su tamaño promedio y potencial zeta. Para el tamaño de las partículas y potencial zeta se empleó una celda S90/ZS90 y DTS1070 respectivamente. Todas las mediciones fueron realizadas en modo automático por triplicado. Para ambas mediciones se utilizó agua desionizada como dispersante y se realizó la medición a temperatura ambiente.

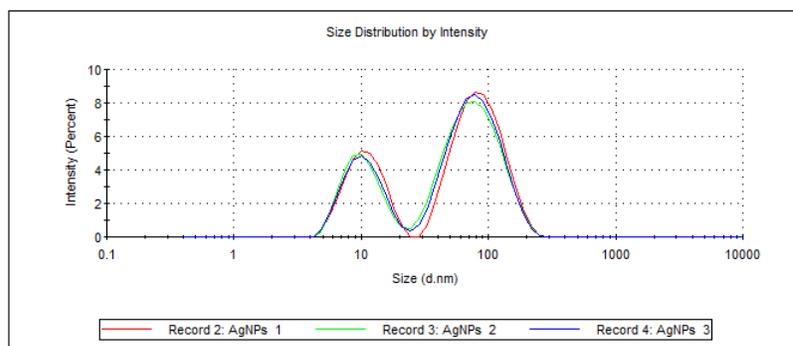


Figura 6.2: Gráfico de medición de tamaño por DLS de AgNPs.

La Fig. 6.2 muestra la distribución de tamaño de las AgNPs cuasi-esféricas en las que se realizaron tres mediciones con una duración de 70 segundos en las cuales se obtuvo un índice de polidispersidad de 0.7, el cual es una medida adimensional de la amplitud de la distribución del tamaño, con valores de 0 a 1, donde los valores superiores a 1 indican que la distribución de tamaños en la muestra es tan polidispersa que puede no ser adecuada para la medición por DLS. Los tamaños de las AgNPs oscilan entre 90.10 y 11 nm mostrando una intensidad de 67.8 y 32.2 %, respectivamente.

También se hicieron mediciones correspondientes al potencial zeta que es una propiedad física en la cual las cargas superficiales neta de las nanopartículas cuando están en una solución son repelidas unas de otras produciendo una repulsión Coulómbica, dicha repulsión entre las cargas de las nanopartículas da lugar a que las partículas no se aglomeren. El criterio de estabilidad de NPs se encuentra con valores de potencial zeta superiores a +30mV e inferiores a -30mV [78].

La Fig. 6.3 muestra la distribución de potencial zeta de las AgNPs cuasi esféricas en las que se realizaron cien mediciones y de las cuales se obtuvo valores de -41.3 mV con una conductividad de 0.105 (mS/cm). Por lo tanto, se concluye que estas nanopartículas son estables en solución acuosa.

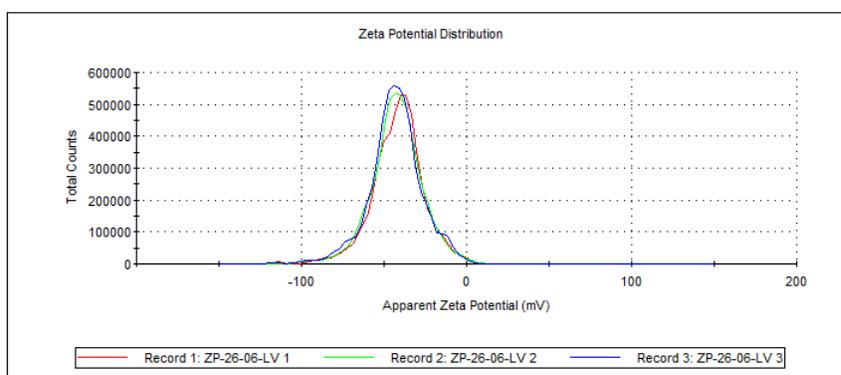


Figura 6.3: Gráfico de medición de potencial zeta por DLS de AgNPs.

6.2.2.2 Espectroscopía de Transmisión Óptica

Los espectrómetros de transmisión óptica que miden en la región UV-visible pueden usarse para medir la absorbancia de luz ultravioleta o visible de una muestra, ya sea a una sola longitud de onda o realizar una exploración en un rango en el espectro. La región UV abarca de 190-400 nm y la región visible abarca de 400-800 nm. Esta técnica se puede usar tanto cuantitativamente como cualitativamente. El esquema de la Fig. 6.4 muestra el esquema de un espectrómetro UV-Vis.

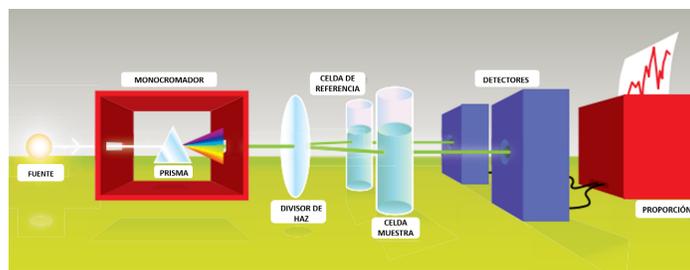


Figura 6.4: Esquema de un espectrómetro UV-Vis [79].

La fuente de luz (una combinación de lámparas de tungsteno/halógeno y deuterio) proporciona la radiación ultravioleta cercana y visible que cubre los 200-800 nm. La salida de la fuente de luz se enfoca en la rejilla de difracción que divide la luz entrante en sus componentes de colores de diferentes longitudes de onda, como un prisma, pero de manera más eficiente.

Para líquidos, la muestra se mantiene en un recipiente transparente y ópticamente plano llamado celda o cubeta. La celda o cubeta de referencia contiene el solvente en el cual se disuelve la muestra y esto se conoce comúnmente como el blanco. Para cada longitud de onda, se mide la intensidad de la luz que pasa a través de una celda de referencia (I_0) y la celda de muestra (I). Si I es menor que I_0 , entonces la muestra ha absorbido algo de luz.

La absorbancia (A) de una muestra está relacionada con I y I_0 de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

El detector convierte la luz entrante en una corriente, cuánto más alta es la corriente, mayor es la intensidad. El registrador de gráficos generalmente grafica la absorbancia contra la longitud de onda (nm) en la sección visible y UV del espectro electromagnético [79].

Para la obtención del espectro de absorbancia óptica se utilizó el espectrómetro USB-650 Red Tide modelo USB-650-UV-VIS en el rango 200-800 nm además del software Ocean Optics SpectraSuite y OriginPro. Se empleó un tiempo de integración de 26ms, un promedio de 10 exploraciones y la celda Ultra micro-cell.

El espectro UV-Vis (Ver Fig. 6.5) confirma la formación de AgNPs preparadas en líquido por el método de reducción química. Este espectro muestra una banda de absorción con un máximo localizado en 428 nm, sugerido por las características del plasmón de resonancia superficial de las AgNPs. La repulsión electrostática entre las AgNPs toma lugar tal que cada nanopartícula está rodeada por moléculas de citrato y en la cual una carga negativa es generada. La absorbancia a 428 nm fue de 1.08.

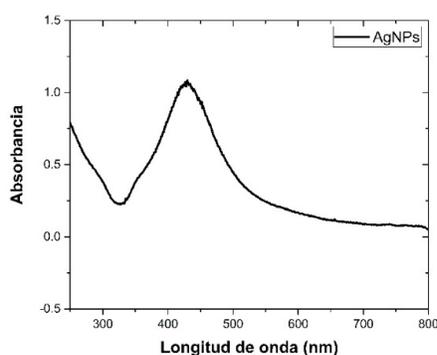


Figura 6.5: Espectro de Transmisión Óptica en la región UV-Vis de AgNPs.

6.2.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) se utiliza para la observación de superficies de muestras. Cuando el espécimen se irradia con un haz de electrones fino (llamado fuente de electrones), los electrones secundarios se emiten desde la superficie del espécimen. La topografía de la superficie se puede observar mediante el escaneo bidimensional de la sonda de electrones sobre la adquisición de la superficie de una imagen de los electrones secundarios detectados.

El SEM requiere un sistema óptico de electrones para producir una sonda de electrones, un lugar para colocar la muestra, un detector de electrones secundarios para recolectar electrones secundarios, una unidad de visualización de imágenes y un sistema operativo para realizar varias operaciones. El sistema óptico de electrones consta de una fuente de electrones, un lente condensador y una lente de objetivo para producir una sonda de electrones, una bobina de exploración para escanear la sonda de electrones y otros componentes. El sistema óptico electrónico (dentro de la columna del microscopio) y el espacio que rodea la muestra se mantienen al vacío (ver Fig. 6.6) [80].

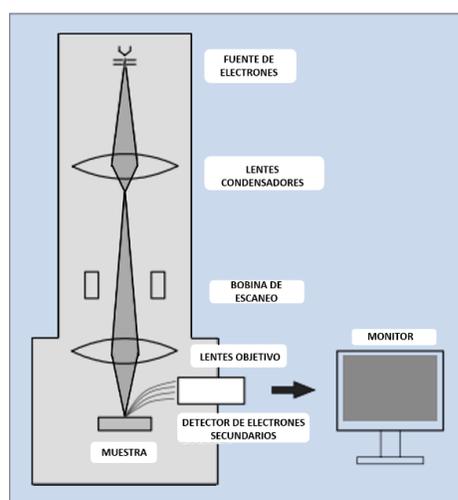


Figura 6.6: Construcción básica de un SEM [80].

Las nanoestructuras metálicas de Ag fueron caracterizadas por medio de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) marca FEI modelo Inspect 150 con magnificaciones que van desde 6000 - 300 000x y con una resolución de haz de electrones de 30 kV a alto vacío. La Fig. 6.7 muestra la micrografía SEM de AgNPs a una concentración de 2.5 mM, donde se aprecia la morfología cuasi esférica de las partículas.

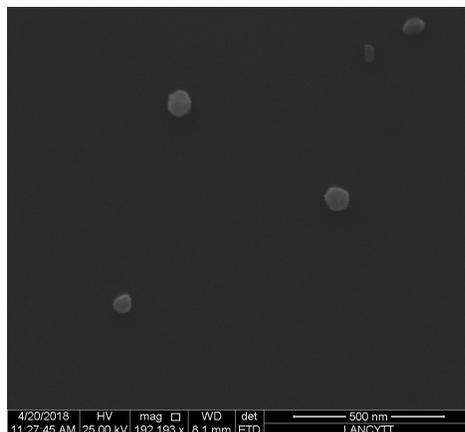


Figura 6.7: Micrografía SEM de AgNPs a 2.5 mM.

6.3 Metodología Parte II: Espectroscopía RAMAN-SERS

6.3.1 Calibración de Ácido Siálico

Las mediciones de RAMAN se llevaron a cabo en un espectrómetro Raman Horiba Jobin Yvon XploRA ONE acoplado a un microscopio óptico Olympus BX4, utilizando un rango de 800-1800nm, 20s de tiempo de adquisición 2 acumulaciones, rejilla de 1800gr/mm, abertura de 100 μ m, una fuente de láser verde a 532 nm. El haz del láser fue enfocado en el centro sobre la muestra con objetivo 10x. Las muestras fueron depositadas sobre una placa de aluminio en pozos con una capacidad de aproximadamente 100 μ l (Ver Fig. 6.8, los pozos están numerados en orden del 1 al 12). Para la técnica de SERS se empleó una relación 2:1 (AS: AgNPs), esto es, 50 μ l AS y 25 μ l de AgNPs para cada pozo, en el caso de la curva de calibración; para las muestras de saliva se utilizaron 50 μ l de saliva y 25 μ l de AgNPs en cada pozo. La fluorescencia fue removida con el software Vancouver Raman Algorithm, para posteriormente graficar con la ayuda del software OriginPro 2016. Se prepararon soluciones de AS a distintas concentraciones: 1, 5, 10, 15, 20, 50, 100 y 200 mg/dl para la curva de calibración.

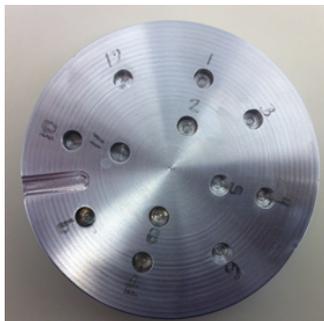


Figura 6.8: Sustrato de aluminio para la medición Raman-SERS.

Se llevó a cabo la medición de los espectros Raman y SERS que aparecen en la Fig. 6.9, dichos espectros muestran el espectro Raman del ácido siálico medido en sólido (línea azul), se aprecian las bandas Raman más significativas en 843, 940, 997, 1109, 1141, 1254, 1369, 1654 y 1723 cm^{-1} , el espectro del ácido siálico en solución a 200 mg/dl (línea verde) y finalmente el espectro SERS que contiene el ácido siálico a 200 mg/dl y nanopartículas de plata (AgNPs) a 2.5 mM (línea roja) con las bandas SERS más significativas en 910, 1171 y 1365 cm^{-1} (solo son las 3 primeras), como se distingue en este último espectro la intensidad de la señal SERS (línea roja) es superior en 3 órdenes de magnitud al espectro Raman del AS sólido (línea azul), lo que comprueba que la técnica SERS es efectiva (línea roja) y por lo tanto, amplifica la señal con la ayuda de las nanopartículas de plata, mientras tanto el espectro de la solución de AS (línea verde) a 200 mg/dl no aporta ninguna información relevante debido a que su dispersante es agua desionizada y la señal Raman pudo llenarse de ruido. Cabe destacar que estas mediciones se realizaron con la disolución de AS a 200 mg/dl , como ya se había mencionado anteriormente, dicha disolución es la mayor de todas, ya que se trabajó con las siguientes disoluciones: 1, 5, 10, 15, 20, 50, 100 y 200 mg/dl como señala la Fig. 6.10 que muestra todos los espectros SERS de todas las disoluciones del AS comercial, todos estos espectros se midieron cada día que se realizaban las mediciones de las muestras de saliva de todos los grupos de estudio mencionados anteriormente. En esta figura se puede distinguir de abajo hacia arriba las concentraciones de AS comercial con AgNPs

de menor a mayor concentración, las bandas SERS más significativas se encuentran en 907 , 1174 y 1365 cm^{-1} que se encuentran en el eje X, mientras que en el eje Y se puede apreciar que la intensidad Raman aumenta conforme se aumenta la concentración de AS, lo que sugiere que la técnica SERS es práctica para la medición de analitos a bajas concentraciones, tal es el caso de 1 mg/dl .

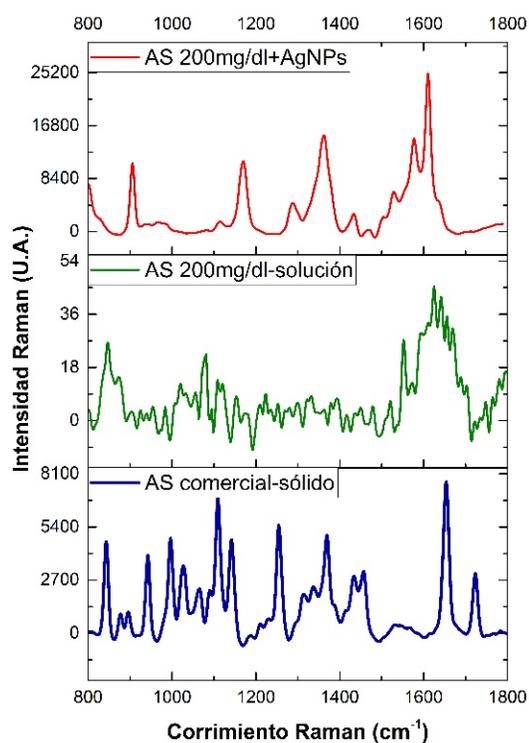


Figura 6.9: Espectros Raman del AS sólido y en solución a 200 mg/dl , y espectro SERS del AS+AgNPs.

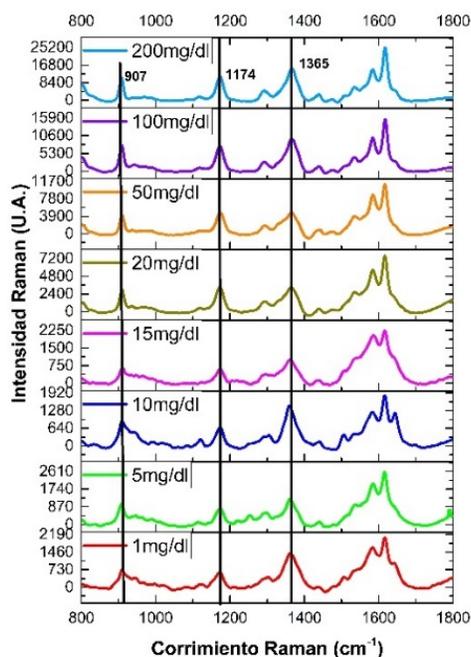


Figura 6.10: Curva de calibración del AS+AgNPs a diferentes disoluciones.

La reproducibilidad de la técnica SERS se puede apreciar en la Fig. 6.11 que muestran 3 curvas de calibración obtenidas en diferentes días de medición, la primera curva de calibración se obtuvo el 22/08/18 con las bandas SERS más significativas en 907, 1174 y 1369 cm^{-1} , la segunda curva de calibración se obtuvo el 10/10/18 con las bandas SERS más significativas en 910, 1174 y 1367 cm^{-1} y la última curva de calibración se obtuvo el 21/11/18 con las bandas SERS más significativas en 910, 1173 y 1371 cm^{-1} , dichas mediciones se hicieron tanto diurnas como nocturnas (en este último caso tarde-noche) y se siguen obteniendo las mismas bandas de resonancia características del AS con un corrimiento de $\pm 5 cm^{-1}$ y un factor de realce que oscila entre $10^3 - 10^4$, lo cual lo hace una técnica muy eficiente y por consiguiente reproducible, en cuanto a la intensidad de las señales obtenidas varía de día a día, pero en la mayoría de los casos se mantiene que la intensidad Raman se intensifica conforme se incrementa la concentración de AS a la medición.

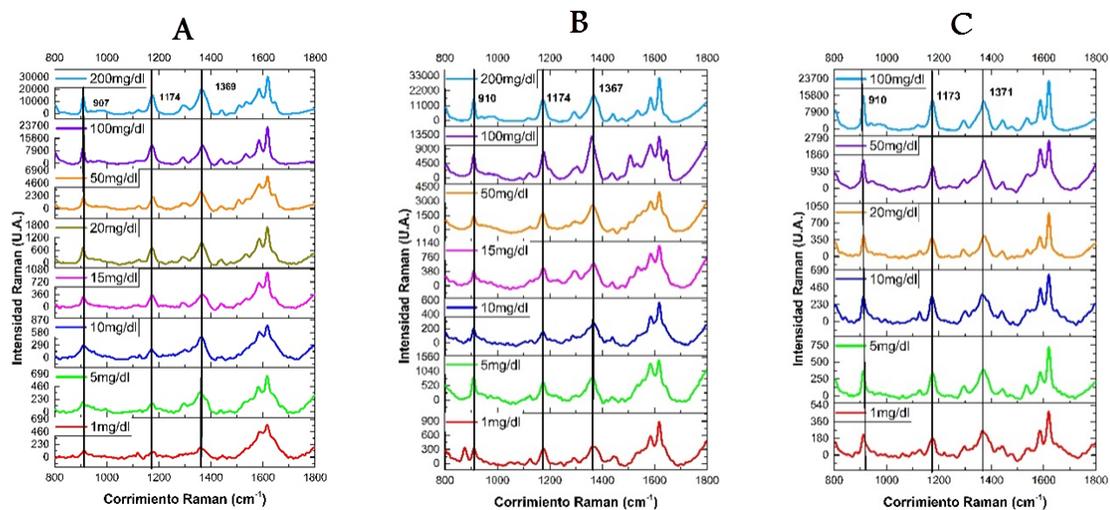


Figura 6.11: Curvas de calibración.

A Curva de calibración de AS a diferentes concentraciones del 22/08/18.

B Curva de calibración de AS a diferentes concentraciones del 10/10/18.

C Curva de calibración de AS a diferentes concentraciones del 21/11/18.

Al analizar la molécula del AS a fondo, en 2014 Vinogradova et. al [41] muestra la asignación a los modos vibracionales tanto Raman como SERS experimental que obtuvo al trabajar con Neu5Ac y AgNPs, aparecen en la Fig. 6.12.

Modo experimental del Raman (cm^{-1})	Modo experimental del SERS (cm^{-1})	Asignación
846mf	850s	$\delta(C-H)$, ecuatorial + $\rho(CH_2)$ in cadena del glicerol*
880m	-	$\nu(C-O-C) + \nu(C-C)$ *
898m	-	$\delta(C-H)$ axial + $\tau(C-H_2)$ en anillo *
945f	942w	$\nu(C-O-C) + \nu(C-O)$ en cadena del glicerol
1001mf	1002vs	$\nu(C-C)$ en anillo, $\nu(C-N)$
1030f	-	$\nu(O-C)$, $\nu(C-C)$ en cadena del glicerol *
1070m	1072w	$\delta(C-H)$, $\delta(C-O-H) + \nu(C-O-C)$ en anillo, asimétrico *
1094m	-	$\nu(C-C)$ en anillo, simétrico + $\nu(C-O)$ *
1110mf	1127s	$\nu(C-C)$, $\nu(C-O)$ asimétrico
1142f	1156w	$\tau(CH_2)$ *
1234h	1237vs	$\nu(C-N)$, amida III
1258mf	-	-
1296md	-	-
1340d	1339m	$\gamma(CH_2)$ * + $\delta(C-O-H)$
1374m	-	$\nu(C-C)$ *
1390md	1391vs	$\nu(CO_2)$
1435m	1423m	$\delta(C-H)$ *
1460m	1454m	$\delta(CH_2)$
1532md	-	$\nu(C-N)$ *
1656f	-	$\nu(C=O)$, amida I
1726m	-	$\nu(C=O)$

Figura 6.12: Números de onda y asignación a los modos vibracionales de las bandas Raman y SERS experimental del Neu5Ac [41].

Nota: δ , tijereteo, γ , aleteo, ν , estiramiento, ρ , balanceo, τ , torsión. Líneas de intensidad Raman: md= muy débil, d= débil, m=medio, f=fuerte, mf= muy fuerte, h= hombro. *Asignación basada en los cálculos de la Teoría de Funciones de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés) [41].

Respecto a la asignación de los modos vibracionales del Neu5Ac presentados en la Fig. 6.12, en las moléculas poliatómicas pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces, se clasifican en cuatro tipos: tijereteo, balanceo, aleteo y torsión, como se muestra a continuación en la

Fig. 6.13 [81].

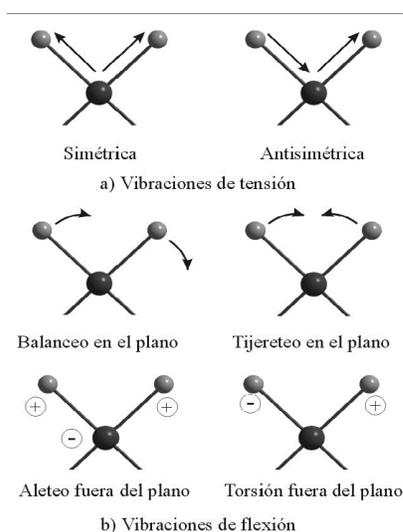


Figura 6.13: Modos vibracionales de las moléculas.

Las bandas más características del Neu5Ac en el modo SERS experimental del artículo de Vinogradova et al. son 1001, 1237 y 1391 cm^{-1} y están atribuidos al anillo de piranosa, grupo acetamida y grupos carboxilos, respectivamente, mientras que las bandas en 1559 y 1585 cm^{-1} se asignaron a los iones de citrato residuales.

En la Fig. 6.14 se hace una comparativa entre los modos vibracionales del Neu5Ac revisados en la literatura y que corresponden al trabajo hecho por Vinogradova et al. y los modos vibracionales experimentados en este proyecto. Se llevó a cabo la respectiva medición de espectroscopía Raman, como ya se había mencionado con anterioridad, que corresponde al espectro en línea azul de la Fig. 6.9 y la línea roja de la misma figura que corresponde al espectro SERS, de este último se recopiló los modos vibracionales más significativos que son 907, 1174 y 1369 cm^{-1} que corresponden a un aleteo axial del enlace C-H más una torsión en el anillo del enlace CH_2 , torsión del enlace CH_2 y estiramiento del enlace C-C, respectivamente para los modos vibracionales.

Modo experimental del Raman (cm^{-1}) Vinogradova et al.	Modo experimental del Raman (cm^{-1}) Hernández-Cedillo	Modo experimental del SERS (cm^{-1}) Vinogradova et al.	Modo experimental del SERS (cm^{-1}) Hernández-Cedillo	Asignación
898m	894d	-	907f	$\delta(C - H)_{axial}$ $+ \tau(C - H_2)$ en anillo *
1142d	1141f	1156d	1174f	$\tau(CH_2)$ *
1374m	1369f	-	1369f	$\nu(C - C)$ *

Figura 6.14: Comparación de los modos vibracionales Raman y SERS de Vinogradova et al. y Hernández-Cedillo.

Nota: δ , tijeeteo, γ , aleteo, ν , estiramiento, ρ , balanceo, τ , torsión. Líneas de intensidad Raman: md= muy débil, d= débil, m=medio, f=fuerte, mf= muy fuerte, h= hombro.

6.3.2 Muestras de Saliva

Para la medición de las muestras de saliva, se llevó a cabo una centrifugación a 6000 rpm (revoluciones por minuto) y posteriormente se obtuvo un sobrenadante de la muestra que fue separado del precipitado, una vez que se obtuvo el sobrenadante pasó a mezclarse con AgNPs, las muestras se colocaron en los pozos de un sustrato de aluminio (Fig. 6.8) en una relación 2:1 (AS: AgNPs), esto es $50\mu L$ de saliva y $25\mu l$ de AgNPs en cada pozo. La fluorescencia fue removida con el software Vancouver Raman Algorithm, para posteriormente graficar con la ayuda del software OriginPro 2016 y se obtuvo el siguiente espectro (ver Fig. 6.15), se observan los espectros de las pacientes numeradas del 1 al 4 (las pacientes son numeradas para evitar mencionar sus nombres por cuestiones éticas), las pacientes 1 y 2 corresponden a mujeres diagnosticadas con lesiones precancerosas o precancerosas (línea verde) y las pacientes 3 y 4 a mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino (línea roja), también se muestran los espectros del ácido siálico comercial (línea azul) de la menor (1 mg/dl) y de la mayor (200 mg/dl) concentración, se puede

observar que los espectros de las pacientes muestran modos vibracionales significativos en 907 , 1174 y 1369 cm^{-1} , por lo que se demuestra que pueden detectarse los modos vibracionales del ácido siálico en las muestras de saliva de pacientes con afecciones como el cáncer cervicouterino y lesiones precancerosas; también cabe mencionar que la intensidad de la señal SERS es mayor en las pacientes de CaCu que en las pacientes con NICs y que se verá reflejado en los resultados de las concentraciones obtenidas.

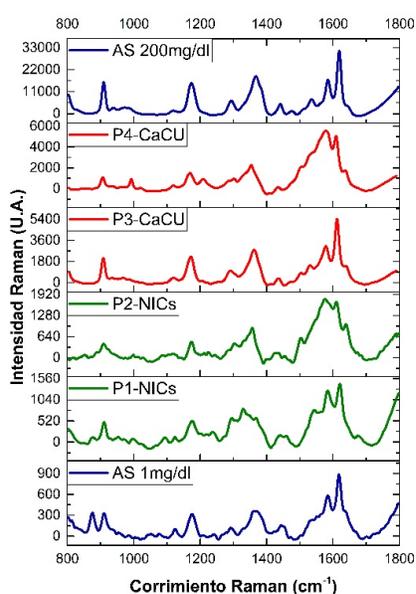


Figura 6.15: Espectros SERS de disoluciones de AS (1 y 200 mg/dl) y de pacientes diagnosticadas con NICs (P1 y P2) y CaCu (P3 y P4).

6.4 Metodología Parte III: Análisis Estadístico y de Diagnóstico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Vancouver Raman Algorithm el cual es un algoritmo para la eliminación automática de la fluorescencia en espectros Raman derivados de muestras biológicas. Después, se utilizó el software OriginPro8.6 para identificar las tres bandas más características 907 , 1174 y 1369 cm^{-1} de la curva de calibración para determinar la concentración de ácido siálico mediante un ajuste a la

curva utilizando la función logarítmica mediante la siguiente ecuación:

$$y = a - b * \ln(x + c)$$

Donde a, b y c son los parámetros de ajuste a la función logarítmica. Se obtuvo un grado de correlación superior a 0.9, como puede observarse en las Figs. 6.16-6.18, lo que indica una precisión en la determinación de las concentraciones de AS tanto en la curva de calibración como posteriormente en las muestras de saliva de los grupos estudiados.

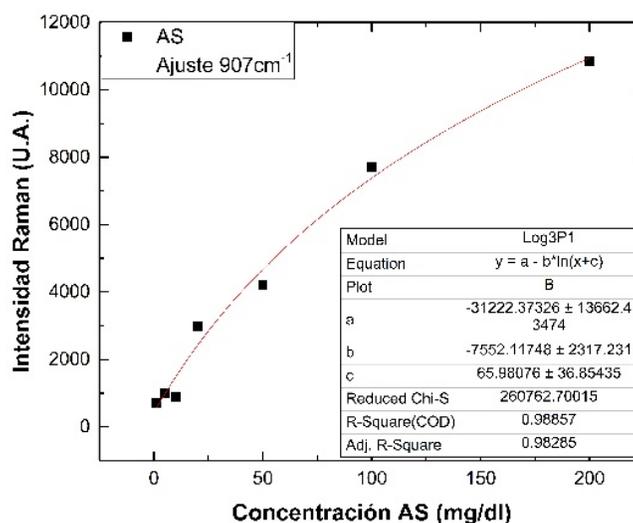


Figura 6.16: Ajuste a la función logarítmica del modo vibracional 907 cm^{-1} del AS.

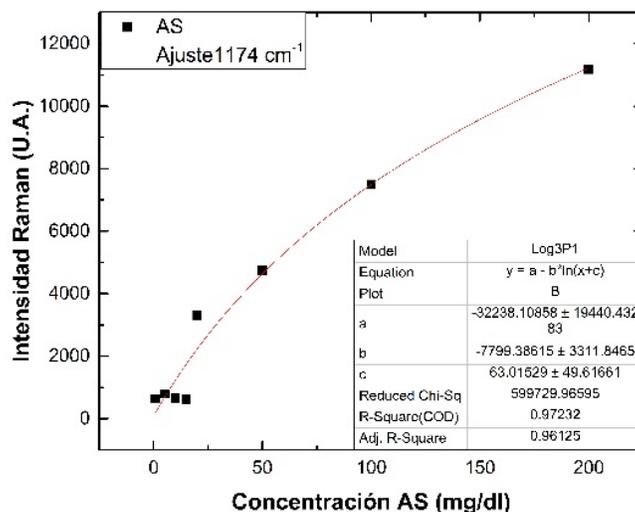


Figura 6.17: Ajuste a la función logarítmica del modo vibracional 1174 cm^{-1} del AS.

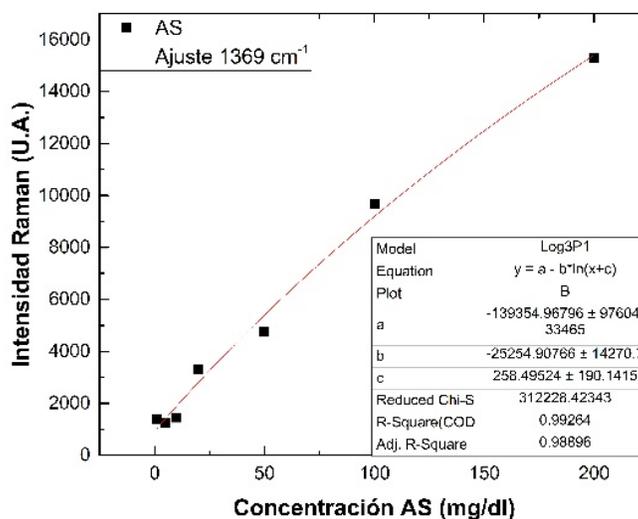


Figura 6.18: Ajuste a la función logarítmica del modo vibracional 1369 cm^{-1} del AS.

Una vez que se obtuvo la curva de calibración y posterior a este paso se obtuvieron las concentraciones de AS para todos los grupos de pacientes con las diferentes afecciones de las que se discutirá en el siguiente capítulo.

También se utilizaron diferentes pruebas estadísticas para el análisis de resultados como son:

Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk:

La prueba de Shapiro-Wilk es una de las pruebas más populares para las pruebas de normalidad de un conjunto de datos experimentales, se considera una de las pruebas más potentes y se basa en la correlación entre las observaciones dadas y las puntuaciones normales asociadas. La prueba de Shapiro-Wilk fue publicada por Shapiro y Wilk en 1965. La ecuación de la prueba es la siguiente:

$$W = \frac{(\sum a_i y_i)^2}{\sum (y - \bar{y})^2}$$

Donde y_i es el número que ocupa la i -ésima posición en la muestra (con la muestra ordenada de menor a mayor), a_i es el i -ésimo valor esperado de las estadísticas de orden normalizadas. Para observaciones distribuidas de forma independiente e idéntica, el valor de a_i puede obtenerse de la tabla presentada por Shapiro y Wilk para tamaños de muestra de hasta 50. W puede expresarse como un cuadrado del coeficiente de correlación entre a_i y y_i . Por lo tanto, W es invariante en cuanto a ubicación y escala, y siempre es menor o igual a 1 [82].

Respecto al procedimiento para la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, la hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_1) se expresan de la siguiente manera [83]:

H_0 : Los datos no siguen una distribución normal.

H_1 : Los datos siguen una distribución normal.

En un gráfico de y_i contra a_i , una línea recta exacta llevaría a W muy cerca de 1. Entonces, si W es significativamente menor que 1, la hipótesis nula será rechazada. Aunque la prueba Shapiro-Wilk W es muy popular, depende de la disponibilidad de los valores de a_i , y para casos de muestra grandes, su cálculo puede ser mucho más complicado. Shapiro y Francia (1972), Weisberg y Bingham (1975) y Royston (1982) han sugerido algunas modificaciones menores a la prueba W [82].

Prueba de comparación de Bonferroni

Nombrado en honor al matemático italiano Carlo Emilio Bonferroni (1892-1960), pero primero atribuido a Olive Jean Dunn, la corrección de Bonferroni compensa las comparaciones múltiples dividiendo el nivel de significación por el número de comparaciones. El nivel de significación es la probabilidad de que una prueba dada encuentre incorrectamente una diferencia en la muestra que no está presente en la población (falso positivo). La corrección de Bonferroni se ajusta para esto al dividir el nivel de significación por el número de pruebas. Esta técnica ha sido criticada por ser demasiado conservadora, particularmente cuando se usa una gran cantidad de pruebas, y puede aumentar el riesgo de un falso negativo. Otras pruebas, como el método de Tukey-Kramer y Scheffe, pueden reducir este riesgo [84].

Además de lo mencionado anteriormente se utilizaron las pruebas diagnósticas, para evaluar dichas pruebas se utilizó el software OriginPro8.6 mediante la construcción del gráfico de la curva ROC, de la que se hablará a detalle más adelante.

La utilidad de las pruebas diagnósticas se basa en la capacidad de separar adecuadamente las personas sanas de las enfermas, y de no producir falsos positivos o negativos. Las propiedades de las pruebas diagnósticas se describen tradicionalmente como sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Una forma adicional de considerar la probabilidad de la enfermedad es mediante el cálculo de la razón de probabilidades o *likelihood ratio*; este permite conocer cuánto más probable es un resultado (positivo o negativo) según la presencia o ausencia de la enfermedad. Las pruebas diagnósticas son utilizadas para diferentes fines: tamizaje de una población, búsqueda de casos, descarte de un diagnóstico, confirmación de un diagnóstico o seguimiento de una patología. Para una correcta evaluación de una prueba diagnóstica se deben conocer los siguientes elementos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y curva ROC (del inglés, receiver operating characteristic curve).

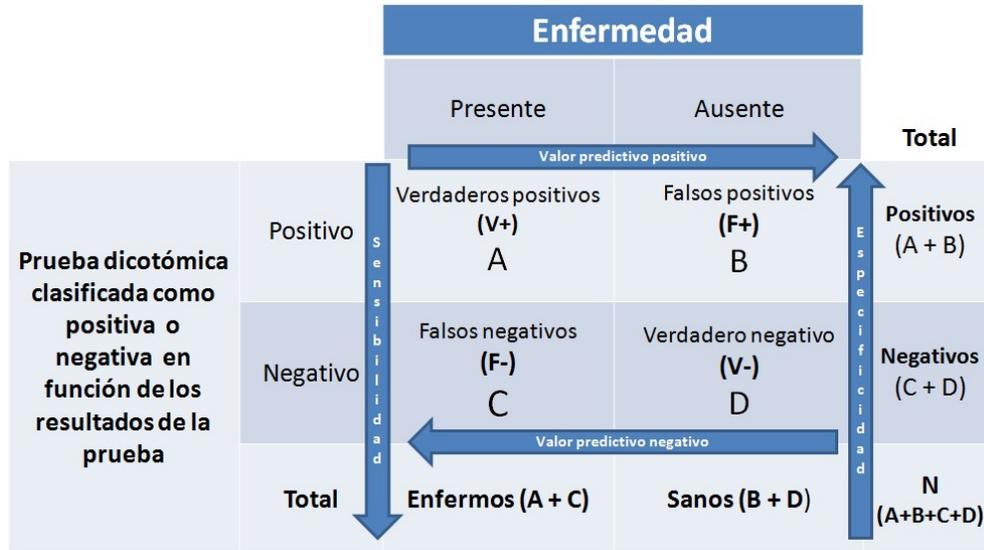


Figura 6.19: Resultados de una prueba diagnóstica [85].

Al hacer el análisis de la evaluación de las pruebas diagnósticas se definen los siguientes conceptos:

Sensibilidad (S): Capacidad de una prueba para identificar correctamente aquellos que tienen la enfermedad. Esta es igual al número de sujetos con una prueba positiva que tienen la enfermedad, dividido entre todos los sujetos que tienen la enfermedad, mediante la siguiente fórmula:

$$S = \frac{A}{(A+C)} \times 100 \%$$

En la Fig. 6.19, la flecha señala la dirección de la sensibilidad desde la enfermedad hacia el resultado de la prueba, es decir, es la probabilidad de que, en un individuo enfermo, la prueba resulte positiva. Así, la sensibilidad es la probabilidad dada por la proporción de sujetos con resultado positivo entre el total de enfermos.

Especificidad (E): Capacidad de una prueba para identificar aquellos que no tienen la enfermedad, y es igual al número de sujetos que resultan negativos a la prueba y que no tienen la enfermedad, dividido entre el número de personas que no tienen la enfermedad o están sanos, mediante la siguiente fórmula:

$$E = \frac{D}{(B+D)} \times 100 \%$$

En la Fig. 6.19 la flecha señala la dirección de la especificidad, y su trayecto indica que va desde la ausencia de enfermedad al resultado de la prueba, es decir, la probabilidad de que, en un individuo no enfermo, la prueba resulte negativa.

Valor Predictivo Positivo (VPP): Es la probabilidad que tiene un individuo de estar enfermo cuando el resultado de la prueba es positivo, en otras palabras, es una probabilidad condicionada a que un paciente que resulte positivo a la prueba tenga la enfermedad. En la Fig. 6.19, la flecha señala la dirección del valor predictivo positivo, desde el resultado de la prueba positiva a la probabilidad de que este individuo esté enfermo. Se evalúa mediante la siguiente fórmula:

$$VPP = \frac{A}{(A+B)} \times 100 \%$$

Valor Predictivo Negativo (VPN): Es la probabilidad de que un individuo que obtenga un resultado negativo a la prueba no presente la enfermedad o esté sano. En la Fig. 6.19 la flecha señala la dirección del VPN, que proviene de un resultado negativo de la prueba y la probabilidad de que el individuo no esté enfermo. Esta probabilidad está condicionada a que un sujeto con resultado negativo no esté enfermo o esté sano. En otras palabras, es la probabilidad de que el paciente no tenga la enfermedad frente a un resultado negativo de la prueba. Se evalúa mediante la siguiente fórmula:

$$VPN = \frac{D}{(C+D)} \times 100 \%$$

Como norma general, cuando se desee evaluar la sensibilidad y la especificidad de una prueba, se debe partir del conocimiento de la presencia o no de la enfermedad en los individuos estudiados, y comparar los resultados de la prueba en evaluación, con una prueba de referencia o “prueba de oro”.

Hasta ahora se ha mencionado sólo la posibilidad de que en una prueba se obtengan dos resultados: positivo o negativo, pero a menudo los resultados de una prueba son en variables continuas, tales como la presión arterial o el nivel de glicemia, no tienen un resultado positivo y otro negativo, sino datos en escala continua. La decisión debe ser, por lo tanto, establecida con un nivel umbral o punto de corte encima del cual el resultado de la prueba es considerado como positivo, y por debajo de éste es considerado negativo. Lo que plantea la necesidad de establecer puntos de corte óptimos en función de los valores continuos medidos, en este sentido, una herramienta que facilita el establecimiento de los puntos de corte es la construcción de las curvas ROC (Curva característica Operativa del Receptor, por sus siglas en inglés).

Curva ROC (Curva característica Operativa del Receptor)

El uso de las curvas ROC minimiza la aparición de falsos positivos, lo cual está asociado con un elevado costo emocional y económico, ya que los pacientes podrían ameritar la repetición de las pruebas, sin que sea del todo necesaria, pues posiblemente pocos de ellos estén realmente enfermos.

Adicionalmente, la implementación de las curvas ROC también disminuye el número de falsos negativos. Los falsos negativos constituyen un serio problema en el manejo clínico, sobre todo cuando se trata de enfermedades graves, ya que se pierde la oportunidad de darle al paciente un tratamiento eficaz en etapas iniciales.

Para construir una curva ROC ésta se representa en un plano cartesiano, graficando sensibilidad versus 1-especificidad. En este sentido, las curvas ROC muestran todos los pares ordenados (sensibilidad, 1-especificidad), resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. El gráfico expresará mayor poder discriminatorio de la prueba, cuanto mayor sea el área bajo la curva, que por lo general es considerado como mayor al 0.8. Las curvas ROC optimizan el punto de corte, es decir, cuanto más sensible y específica sea la prueba (puntos más hacia arriba y más hacia la izquierda en la gráfica), más se alejará de la diagonal, lo cual es

considerado como el mejor punto de corte [85], como se puede observar en la Fig. 6.20 la clasificación de la prueba como mala, regular y buena en función del área bajo la curva obtenida de la curva ROC [86].

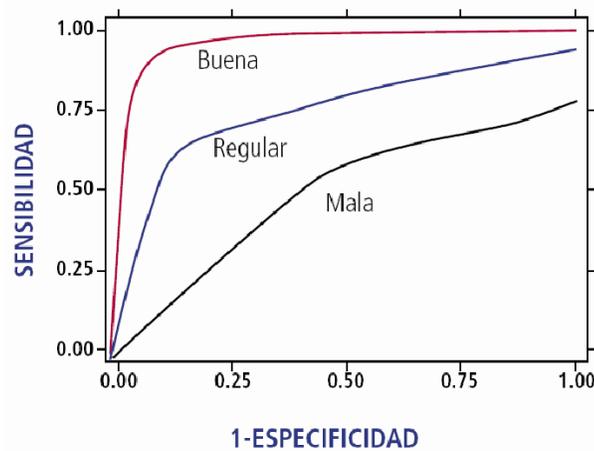


Figura 6.20: Tipos de curva ROC [86].

Cuando se construyen las curvas ROC existen varios métodos que permiten la identificación del punto de corte ideal. Dos de ellos son el método de distancias mínimas y la determinación de los índices de Youden. En el primero, se trazan líneas que unan los distintos puntos de corte con la coordenada (1,0), que corresponde a una sensibilidad y especificidad del 100 %, la línea que tenga la menor distancia es la que está conectada con el punto de corte ideal, que representa el mejor par (sensibilidad, 1-especificidad). Por su parte, el método de Youden requiere la determinación de un índice para cada punto de corte posible. El cual se calcula a través de la fórmula:

$$IY = (S + E) - 1$$

El punto de corte con el mayor índice corresponde al ideal [85].

Autores como Galen y Gambino et al. han sugerido una serie de postulados de tipo práctico respecto a las características de una prueba diagnóstica para elegir el valor del punto de corte a tomar en cuenta.

1. Elegir la mayor sensibilidad cuando:
 - a.* La enfermedad sea grave y no pueda pasar inadvertida.
 - b.* La enfermedad sea tratable.
 - c.* Los resultados de falsos positivos no supongan un traumatismo psicológico o económico en los individuos examinados.

2. Elegir la mayor especificidad posible cuando:
 - a.* La enfermedad sea importante, pero difícil de curar o incurable.
 - b.* El hecho de conocer que no se padece la enfermedad tiene una importancia sanitaria y psicológica.

3. Debe utilizarse una prueba con un alto valor predictivo positivo cuando el tratamiento de los falsos positivos pueda tener consecuencias graves.

4. Un valor global elevado se desea cuando:
 - a.* La enfermedad sea importante, pero curable.
 - b.* Tanto los falsos positivos como los falsos negativos supongan un traumatismo y éste conlleve consecuencias graves [86].

Capítulo 7

Análisis y Discusión de Resultados

7.1 Resultados Parte I: Lesiones Precancerosas y Cáncer

Cervicouterino Invasor

Resultados de ambos hospitales: Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, San Luis Potosí, S.L.P y “Hospital General de Ciudad Valles”, Ciudad Valles, San Luis Potosí, S.L.P.

Grupos: Lesiones precancerosas (NICs) vs Cáncer cervicouterino invasor (CaCu)

El grupo total de pacientes femeninas de ambos hospitales fue de 50 pacientes, divididas en dos grupos: NICs y CaCu con 41 y 9 pacientes, respectivamente. La información obtenida de la hoja de recolección de datos de las pacientes de ambos grupos como edad, peso, estatura e índice de masa corporal (IMC) se reúnen en la Tabla 7.1 que nos señala que la media de las edades de ambos grupos son muy comparables; respecto al peso y estatura son similares y por último el IMC con un valor promedio de 28.10 para las NICs y 27.23 para CaCu indica que la mayoría de las pacientes sufre de sobrepeso de acuerdo a la OMS que clasifica el IMC con un valor entre 25.0 hasta 29.99 como sobrepeso [87].

Tabla 7.1: Media y desviación estándar de los datos obtenidos (edad, peso, estatura y IMC) de los grupos: CaCu y NICs.

Datos/grupos	NICs	CaCu
Edad (años)	43 ± 12	39 ± 10
Peso (kg)	67.81 ± 12.38	67.96 ± 12.03
Estatura (m)	1.55 ± 0.06	1.57 ± 0.06
IMC	28.10 ± 5.12	27.23 ± 4.11

En la Fig. 7.1.A. se muestra el gráfico de nube correspondiente a las concentraciones de AS en saliva, en el que se observa que la mayoría de las concentraciones pertenecientes a las NICs (puntos negros) se aglutinan debajo de la concentración de 25 mg/dl, pero aparecen de 2-7 puntos atípicos con altas concentraciones de AS, dichos puntos corresponden a pacientes diagnosticadas con lesiones precancerosas clasificadas como NIC2/3 que varían desde 45-123 mg/dl, estas pacientes muestran un incremento de AS en saliva a diferencia del resto del grupo, este comportamiento se debe a que son lesiones de alto grado que estarían progresando a un cáncer cervicouterino invasor, de hecho los médicos refieren a las lesiones NIC2/3 como lesiones precursoras del cáncer y el Instituto Nacional del Cáncer clasifica esta lesión como el estadio 0 del cáncer cervicouterino [88], por lo que podría hacerse un seguimiento de dichas pacientes para corroborarlo con su historial clínico.

Es importante mencionar que las lesiones de bajo grado NIC1 muestran concentraciones de AS más bajas que las lesiones de alto grado NIC2/3, exceptuando sólo una paciente que tiene una concentración de AS de 45.86 mg/dl, a la cual podría hacerse un seguimiento; es de suma importancia detectar cuales lesiones progresarán a un cáncer y de esta manera evitar procedimientos quirúrgicos innecesarios de detección, tal es el caso de las lesiones NIC1, ya que las pacientes que padecen estas lesiones son tratadas a veces innecesariamente.

En el caso de las concentraciones de AS pertenecientes al grupo CaCu estas se muestran más dispersas (puntos rojos) y varían desde 8-100 mg/dl, dicho grupo reúne concentraciones de todos los estadios clínicos desde el estadio 1 al 4; por último, cabe mencionar que la concentración más alta del grupo de lesiones precancerosas es de 123.31 mg/dl, mientras que para el grupo de CaCu es de 99.21 mg/dl.

En cuanto al grupo de CaCu, a pesar de que este grupo de pacientes es estadísticamente pequeño, lo cual se debe a los rigurosos criterios de inclusión y exclusión (señalados en el capítulo IV), es relevante mencionar que la población global de este tipo de cáncer es de menor incidencia que el cáncer de mama; aun así, podemos vislumbrar que los datos obtenidos nos permiten establecer resultados concisos para esta prueba.

Respecto a los resultados estadísticos, tanto la media como la mediana (Fig. 7.1.B.) en el grupo de CaCu tiene una mayor concentración de AS comparada con en el grupo de lesiones NICs, esta última información puede visualizarse en la Tabla 7.2 incluye los valores numéricos de la media, más/menos la desviación estándar, la mediana, el primer y tercer intercuartil, así como también el valor de ρ que se obtuvo de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Al analizar estos datos nos permite establecer que la concentración de AS en saliva se eleva cuando hay presencia de cáncer cervicouterino invasor, lo que responde a la pregunta de investigación que al incrementar la severidad (pasando de una lesión precancerosa a un cáncer cervicouterino invasor) de la enfermedad aumenta la concentración de AS en saliva en las pacientes femeninas.

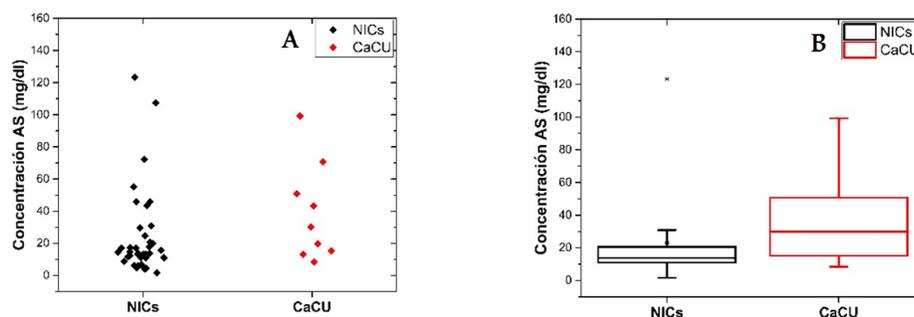


Figura 7.1: A. Gráfico de nube de las concentraciones de AS de los grupos NICs y CaCu de ambos hospitales.

B. Gráfico de caja de las concentraciones de AS de los grupos NICs y CaCu de ambos hospitales.

Tabla 7.2: Concentraciones de AS (mg/dl) para los grupos de NICs y CaCu.

	NICs	CaCu
No. pacientes	41	9
Concentración de AS (mg/dl)	23.11 ± 25.82 13.78 (11.01 ? 20.59)	38.9 ± 30.43 30.03 (15.19 ? 50.65)
Valor de ρ (Nivel de significancia $\rho < 0.005$)	$(1.44 \times 10)^{-8}$ (No. Normal)	0.2199 (Normal)

Para ampliar más el estudio se aplicaron varias pruebas estadísticas a los grupos: NICs y CaCu, entre ellas se aplicó la prueba de Bonferroni donde se obtiene que no hay diferencia significativa entre ambos grupos, la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk menciona que al nivel de significancia de 0.05 los datos del grupo de CaCu siguen una distribución normal de la población, mientras que los datos del grupo de NICs siguen una distribución no normal de la población. Por último, se obtuvo una curva ROC (Fig. 7.2) para establecer el área bajo la curva y el mejor punto de corte de concentración de AS global para ambos grupos estudiados, así mismo, también se estableció la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, dichos datos aparecen en la Fig. 7.3.

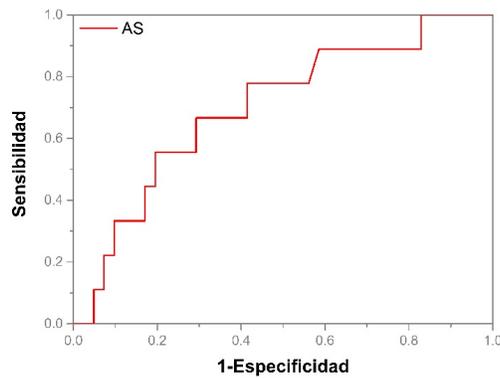


Figura 7.2: Curva ROC de las concentraciones de AS de los grupos NICs y CaCu.

Los datos obtenidos de la curva ROC señalan un 70 % del área bajo dicha curva, esto indica que la prueba de ácido siálico está por encima del porcentaje que clasifica a la prueba como regular, lo cual es buen parámetro para evaluar la prueba del AS en saliva. El área bajo la curva ROC es obtenida al asignar números binarios a las concentraciones de ácido siálico, donde el 1 representa las concentraciones de AS de personas enfermas (grupo CaCu), es decir, los positivos, y el 0 representa las concentraciones de AS de personas sanas (grupo NICs), es decir, los negativos. El mejor punto de corte se determinó mediante el índice de Youden [85], por lo tanto, se estableció que la concentración de **AS>15 mg/dl en saliva** es el mejor para los grupos de todas las lesiones precancerosas (NICs) y cáncer cervicouterino invasor (CaCu), dicho punto de corte nos señala que arriba de esta concentración se encuentran todas las personas enfermas y debajo todas las personas sanas de un grupo total de 50 pacientes femeninas de ambos hospitales.

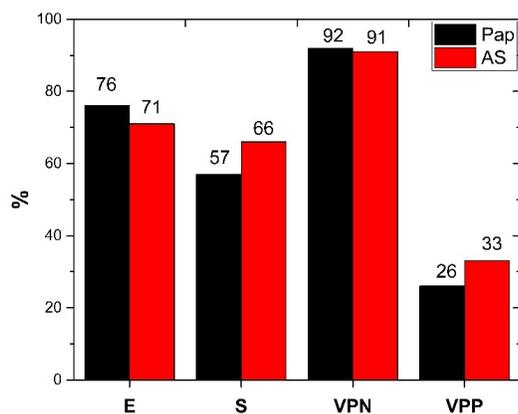


Figura 7.3: Comparación de los datos obtenidos mediante frotis de Papanicolaou y prueba de AS en saliva en grupos de NICs y CaCu.

En la Fig. 7.3 se muestra la comparativa de los porcentajes obtenidos del frotis de Papanicolaou publicado por M. U. Barut et al. en 2015 [15] (barras color negro) versus la prueba de AS en saliva (barras color rojo) de 2018, para el Pap se obtuvieron los siguientes porcentajes: especificidad (E) del 76 %, sensibilidad (S) del 57 %, valor predictivo negativo (VPN) 92 % y valor predictivo positivo (VPP) 26 %; mientras que para la prueba de AS en saliva se obtuvo: E del 71 %, S del 66 %, VPN del 91 % y VPP del 33 %.

Se observa que la prueba de AS en saliva mejora los porcentajes de sensibilidad y el valor predictivo positivo, disminuye en el porcentaje de especificidad y se mantiene en el porcentaje del valor predictivo negativo; dichos porcentajes nos señalan que debemos trabajar más para poder incrementar el porcentaje de especificidad de la prueba y de esta manera poder clasificar correctamente una paciente sana.

Aún a pesar de este último porcentaje, la prueba del AS en saliva mejora el porcentaje de sensibilidad, mostrando un 66 % en comparación con el porcentaje reportado en la literatura de M. U. Barut et al. [15], lo que señala que es posible clasificar correctamente una paciente enferma y de esta manera reducir procedimientos quirúrgicos innecesarios

en las pacientes.

Respecto a los valores predictivos, se mejoró ligeramente el porcentaje del VPP lo que sugiere que es posible predecir que una paciente esté enferma cuando el resultado de la prueba es positivo, es decir, tener la certeza de su enfermedad, de igual manera se evitarían los procedimientos médicos innecesarios como también se evitaría estrés emocional en las pacientes derivado de un mal diagnóstico y/o tamizaje, podría trabajarse más adelante para mejorar este porcentaje; por el contrario en el porcentaje del VPN, este se mantuvo, dicho porcentaje nos da la certeza de predecir que una paciente esté sana cuando el resultado de la prueba es negativa, aunque el porcentaje se mantiene, es un buen porcentaje.

Para la obtención de los porcentajes de E, S, VPN y VPP, se utilizaron los siguientes datos conocidos como Verdadero Positivo (VP), Falso Negativo (FN), Falso Positivo (FP) y Verdadero Negativo (VN) [89]:

- VP: número de pacientes enfermos (Pap positivo) en los que la prueba resultó positiva (tamizaje correcto).
- FN: número de pacientes enfermos (Pap positivo) en los que la prueba resultó negativa (tamizaje incorrecto).
- FP: número de pacientes sanos (Pap negativo) en los que la prueba resultó positiva (tamizaje incorrecto).
- VN: número de pacientes sanos (Pap negativo) en los que la prueba resultó negativa (tamizaje correcto).

Resultando en los siguientes porcentajes: VP 12 %, FN 6 %, FP 24 % y VN 58 % del total de la población de mujeres estudiadas. Como ya lo había mencionado Sánchez-Nava et al. [90] en 2013, “ningún método (diagnóstico o tamizaje) está exento de errores, por lo cual se producen falsos negativos (FN), de 5-10 % hasta 35 % que representan una de

las mayores causas de fallo de los programas de detección oportuna”. Estos FN suponen y citando en sus palabras una “derrota” del método utilizado ya que en el seguimiento de la paciente al volver a hacer el examen se detectará una patología en un estadio más avanzado. Es concluyente mencionar que la prueba del AS en saliva obtuvo un 6 % de FN lo que supone un porcentaje de tasa baja.

Sánchez-Nava et al. también menciona que cuando se decide que prueba de tamizaje utilizar es muy importante seleccionar la de mayor especificidad, debido a que las pruebas con especificidad baja son aplicadas en la población sana, con muy baja prevalencia de la enfermedad resulta en una mayor proporción de falsos positivos.

Resumiendo, al analizar los grupos de NICs versus CaCu no se obtuvo diferencia significativa entre ambos, también se obtuvo un bajo porcentaje de especificidad del 71 % y una alta tasa de falsos positivos del 24 %, es importante mencionar que un bajo porcentaje de especificidad concluye que no es realmente una buena prueba de tamizaje a elegir y que una alta tasa de falsos positivos puede derivar en una sobre detección de NICs que encauzan a tratamientos innecesarios para mujeres que de hecho no corren ningún riesgo de padecer cáncer cervicouterino en ese momento.

Por lo cual la meta sería reducir el número de falsos positivos, para esto se presentarán los datos de dos grupos a estudiar: lesiones precancerosas de bajo grado (NIC1) versus el grupo de lesiones precancerosas de alto grado (NIC2/3) y cáncer cervicouterino invasor (CaCu), esto se debe a que las lesiones precancerosas de alto grado son precursoras del cáncer, como ya se había mencionado con anterioridad. Al estudiar estos grupos se pretende elevar el porcentaje de especificidad y reducir la tasa de falsos positivos.

Grupos: Lesiones precancerosas de bajo grado (NIC1) vs Lesiones precancerosas de alto grado (NIC2/3) y Cáncer cervicouterino invasor (CaCu)

El grupo total de pacientes femeninas de ambos hospitales fue de 50 pacientes, ahora están divididas en dos nuevos grupos de estudio: NIC1 vs NIC2/3+CaCu con 30 y 20 pacientes, respectivamente. Los datos de las pacientes de ambos grupos como edad, peso, estatura e índice de masa corporal (IMC) se reúnen en la tabla 17 y nos señalan el mismo comportamiento que la Tabla 7.3 de datos.

Tabla 7.3: Media y desviación estándar de los datos obtenidos ((edad, peso, estatura y IMC) de los grupos: NIC1 y NIC2/3+CaCu.

Datos/grupos	NIC1	NIC2/3+CaCu
Edad (años)	44 ± 12	40 ± 11
Peso (kg)	69.54 ± 13.40	65.29 ± 9.91
Estatura (m)	1.55 ± 0.06	1.56 ± 0.06
IMC	28.84 ± 5.46	26.60 ± 3.72

En la Fig. 7.4.A. se muestra el gráfico de nube correspondiente a las concentraciones de AS en saliva, dicho gráfico muestra que dentro de las concentraciones de AS del grupo de NIC1 (puntos negros) se observan sólo 2 puntos atípicos con mayor concentración (29.51 y 45.86 mg/dl) que el resto de las concentraciones que se encuentran debajo de los 21 mg/dl de concentración de AS en saliva, mientras que el grupo de NIC2/3+CaCu (puntos rojos) muestra concentraciones más dispersas desde 1.6 hasta 123.31 mg/dl. En la Fig. 7.4.B. se resalta que la mediana del grupo de NIC2/3+CaCu es mayor que el grupo NIC1, lo mismo sucede con las medias de ambos grupos, esta última información puede visualizarse en la Tabla 7.4 que incluye los valores numéricos de la media, más/menos la desviación estándar, la mediana, el primer y tercer intercuartil, así como también el valor de ρ que se obtuvo de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Cabe

destacar que la concentración de AS en saliva es mayor en el grupo de NIC2/3+CaCu que en el grupo de NIC1 para ambos hospitales del grupo total de pacientes femeninas.

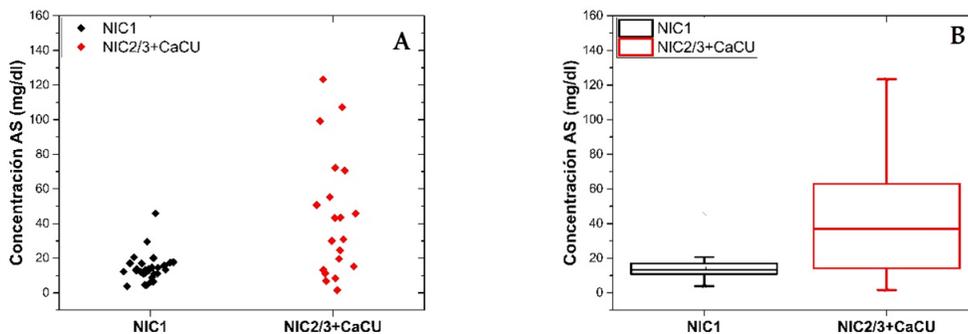


Figura 7.4: A. Gráfico de nube de las concentraciones de AS de los grupos NIC1 y NIC2/3+CaCu de ambos hospitales.

B. Gráfico de caja de las concentraciones de AS de los grupos NIC1 y NIC2/3+CaCu de ambos hospitales.

Tabla 7.4: Concentraciones de AS (mg/dl) para los grupos de NIC 1 y NIC2/3+CaCu .

	NIC 1	NIC2/3+CaCu
No. pacientes	30	20
Concentración de AS (mg/dl)	14.19 ± 8.00 13.22 (10.86 ? 16.95)	38.9 ± 30.43 30.03 (15.19 ? 50.65)
Valor de ρ (Nivel de significancia $\rho < 0.005$)	$(4,46 \times 10)^{-5}$ (No. Normal)	0.2199 (Normal)

Para el análisis estadístico se aplicaron varias pruebas para ambos grupos estudiados (NIC1 vs NIC2/3+CaCu), entre ellas se aplicó la prueba de Bonferroni donde se obtiene que hay diferencia significativa entre ambos grupos, lo cual es un resultado sobresaliente ya que hace que la prueba de AS en saliva sea útil para diferenciar estos dos grupos.

La prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk menciona que al nivel de significancia de 0.05 los datos del grupo de NIC2/3+CaCu siguen una distribución normal de la población de concentraciones, mientras que los datos del grupo de NIC1 siguen una distribución no normal de la población. Por último, se obtuvo una curva ROC (Fig. 7.5)

para establecer el mejor punto de corte de concentración de AS global para ambos grupos estudiados y el área bajo la curva, así mismo, también se estableció la sensibilidad, especificidad y valores predictivos que aparece en la Fig. 7.6.

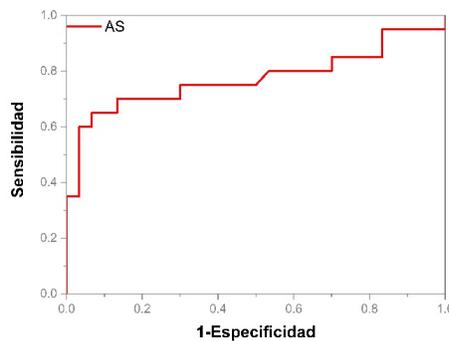


Figura 7.5: Curva ROC de las concentraciones de AS de los grupos NIC1 y NIC2/3+CaCu.

Los datos obtenidos de la curva ROC señalan un 77.25 % del área bajo dicha curva, esto indica que la prueba de ácido siálico está por encima del porcentaje que clasifica a la prueba como buena, este es un resultado excelente que nos permite establecer buenos porcentajes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos derivados de esta curva todo esto para evaluar la efectividad de la prueba del AS en saliva. El mejor punto de corte se determinó mediante el índice de Youden [85], por lo tanto, se estableció que la concentración de **AS>22 mg/dl en saliva** es la mejor para los grupos de las lesiones precancerosas de bajo grado (NIC1) vs lesiones de alto grado (NIC2/3) y cáncer cervicouterino invasor (CaCu), dicho punto de corte nos señala que arriba de esta concentración se encuentran todas las personas enfermas y debajo todas las personas sanas de un grupo total de 50 pacientes femeninas de ambos hospitales.

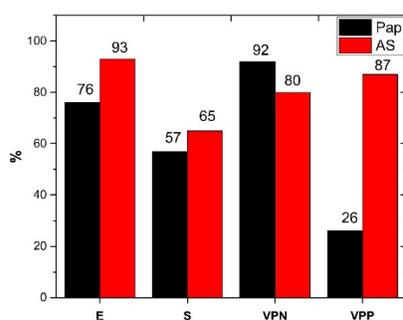


Figura 7.6: Comparación de los datos obtenidos mediante frotis de Papanicolaou y prueba de AS en saliva en grupos de NIC1 y NIC2/3+CaCu.

En la Fig. 7.6 se muestra la comparativa de los porcentajes obtenidos del frotis de Papanicolaou publicado por M. U. Barut et al. en 2015 [15] (barras color negro) versus la prueba de AS en saliva (barras color rojo) de 2018 (sólo grupos: NIC1 y NIC2/3+CaCu) para el Pap se obtuvieron los siguientes porcentajes: especificidad (E) del 76 %, sensibilidad (S) del 57 %, valor predictivo negativo (VPN) 92 % y valor predictivo positivo (VPP) 26 %; mientras que para la prueba de AS en saliva se obtuvo: E del 93 %, S del 65 %, VPN del 80 % y VPP del 87 %.

Se observa que la prueba de AS en saliva mejora los porcentajes de especificidad, sensibilidad y el valor predictivo positivo y sólo disminuye en el porcentaje del valor predictivo negativo, de este último a pesar de la disminución se mantiene en un buen rango de porcentaje, es decir, del 80-100 %. Es importante mencionar que se logró lo deseado, es decir, incrementar el porcentaje de especificidad de la prueba del AS en saliva en comparación con el Frotis de Papanicolaou, lo cual es un excelente resultado, puesto que se encuentra arriba del 90 %, por lo cual es posible clasificar correctamente y con mayor certeza a una paciente sana. Respecto a la sensibilidad se mantiene el porcentaje respecto al mostrado en la Fig. 7.4.A. por la misma prueba del AS en saliva y por último, hay un incremento sustancial en el valor predictivo positivo de la prueba del AS en saliva

llegando al 87 % en comparación con el Frotis de Papanicolaou de lo cual podemos obtener que es muy probable identificar a una paciente enferma cuando resulte positivo a la prueba, por lo que la prueba del AS en saliva como método de tamizaje es más eficaz y certera para diferenciar entre: lesiones de bajo grado (NIC1) y lesiones de alto grado (NIC2/3) y cáncer cervicouterino invasor (CaCu).

Para la obtención de los porcentajes de E, S, VPN y VPP, se utilizaron los siguientes datos conocidos como Verdadero Positivo (VP), Falso Negativo (FN), Falso Positivo (FP) y Verdadero Negativo (VN).

Resultando en los siguientes porcentajes: VP 26 %, FN 14 %, FP 4 % y VN 56 % del total de la población de mujeres estudiadas. De estos últimos resultados, es importante mencionar que la prueba del AS en saliva en los grupos de NIC1 y NIC2/3+CaCu obtuvo un 14 % de FN lo cual es una alta tasa de pacientes en comparación la tasa obtenida con los grupos NICs y CaCu, a pesar de esto hubo una enorme disminución del porcentaje de FP para los grupos NIC1 y NIC2/3+CaCu en comparación con los grupos de todas las lesiones precancerosas y CaCu, lo cual es un extraordinario resultado.

Sánchez-Nava et al. [90] menciona que cuando se decide que prueba de tamizaje utilizar es muy importante seleccionar la de mayor especificidad, basándonos en esto último la prueba de AS en saliva tiene un porcentaje altísimo de especificidad del 93 % lo cual lo hace una prueba importante para seleccionar como prueba de tamizaje.

Al incrementar los porcentajes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, se puede apoyar a las pacientes dándoles certeza acerca de su padecimiento o en dado caso de la ausencia de este. Para que así puedan evitar cirugías o tratamientos innecesarios como quimioterapia o radioterapia y así tener la seguridad de su estado, como también se pueden evitar episodios de ansiedad, depresión o estrés derivados de un mal diagnóstico (o en este caso, tamizaje). También, estos porcentajes nos demuestran que la prueba de AS puede ser una herramienta significativa a utilizar como método de tamizaje para este tipo de cáncer, en especial para diferenciar las lesiones precancerosas de bajo grado

(NIC1) de las lesiones de alto grado (NIC2/3) y el cáncer cervicouterino invasor (Ca-Cu), esta prueba no es subjetiva y depende únicamente de una técnica física y pruebas estadísticas, por lo cual puede ser competitiva contra los métodos actuales de tamizaje, en especial del frotis de Papanicolaou.

7.2 Resultados Parte II: Periodontitis, Gingivitis y Control

El grupo global de pacientes femeninas que acudieron a evaluación periodontal a la clínica de Periodoncia de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) fue de 93 pacientes, subdivididas en 3 grupos de estudio: 33 pacientes con diagnóstico de periodontitis, 30 pacientes con diagnóstico de gingivitis y 30 pacientes sanas (también llamado grupo control), se recolectaron datos respectivos a cada paciente, entre los que incluyen: edad, peso, estatura, índice de masa corporal (IMC) que se reúnen en la Tabla 7.5, también se muestra el resultado de los parámetros oral como son la profundidad de la bolsa y la pérdida de inserción clínica (CAL) en milímetros para el diagnóstico ya sea sano, gingivitis o periodontitis de las pacientes. Los datos obtenidos muestran que la edad, peso y estatura promedio de los tres grupos son bastante comparables, mientras que el Índice de Masa Corporal (IMC) con un valor global de 28.33 para todos los grupos indica que la mayoría de las pacientes sufre de sobrepeso de acuerdo con la OMS que clasifica el IMC entre 25.0 hasta 29.99, en cuanto a la profundidad de la bolsa y la pérdida de inserción clínica ambos parámetros aumentan en milímetros conforme se avanza de un estadio sano pasando por la enfermedad gingival hasta una enfermedad periodontal.

Tabla 7.5: Media y desviación estándar de los datos obtenidos (edad, peso, estatura, IMC, profundidad del surco gingival y pérdida de inserción clínica) de los grupos: control, gingivitis y periodontitis.

Datos/grupos	Control	Gingivitis	Periodontitis
Edad (años)	45 ± 9	47 ± 14	45 ± 9
Peso (kg)	75.38 ± 11.81	74.89 ± 13.32	72.99 ± 18.47
Estatura (m)	1.61 ± 0.07	1.61 ± 0.06	1.58 ± 0.19
IMC	28.86 ± 5.18	29.50 ± 7.95	26.84 ± 3.91
Profundidad del surco gingival (mm)	1.66 ± 0.17	2.04 ± 0.49	3.95 ± 0.60
Pérdida de inserción clínica (CAL, mm)	1.48 ± 0.18	1.83 ± 0.25	3.94 ± 0.57

La Fig. 7.7.A. muestra inmediatamente que las concentraciones de AS en saliva medidas para las pacientes con periodontitis difieren significativamente del rango resultante de concentraciones medidas para las pacientes con gingivitis y/o las pacientes control. Las concentraciones del grupo control se aglutinan debajo de la concentración de 12 mg/dl, mientras que se muestran tres puntos atípicos en el grupo de gingivitis que corresponde a concentraciones de 57.57, 67.57 y 70.42 mg/dl, mientras que el resto de las concentraciones se concentran por debajo de 17 mg/dl de concentración de AS, lo mismo sucede con el grupo de periodontitis que muestra dos puntos atípicos que corresponde a concentraciones de 59.3 y 85.86 mg/dl.

En la Fig. 7.7.B. se muestra un gráfico de caja de la mediana de la concentración como función de la salud oral para ilustrar el rango de valores medidos para las concentraciones de AS para los tres grupos de pacientes. La inspección de esta figura sugiere claramente que el grupo de periodontitis tiene diferencias significativas respecto con los otros dos grupos de pacientes (gingivitis y control).

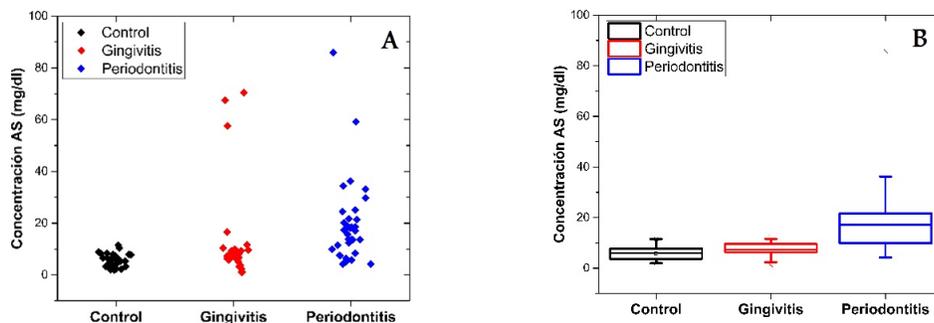


Figura 7.7: A. Gráfico de nube de las concentraciones de AS de los grupos control, gingivitis y periodontitis.

B. Gráfico de caja de las concentraciones de AS de los grupos control, gingivitis y periodontitis.

La Tabla 7.6 incluye los valores numéricos de la media, más/menos la desviación estándar, la mediana, el primer y tercer intercuartil, así como también el valor de ρ que se obtuvo de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. En esta tabla se puede leer que los valores resultantes de la media para las concentraciones de AS son menores para el grupo control y para aquellas con gingivitis en comparación con el valor alto de la media para pacientes con periodontitis.

Es necesario mencionar que en la Fig. 7.7.A., se detectaron tres concentraciones atípicas en el grupo de pacientes con gingivitis, que afectan gravemente la estimación de la media, pero no de la mediana de la concentración de AS en saliva que da como resultado mayor para el grupo control y menor para el grupo de periodontitis; en comparación, las concentraciones medias de concentración de AS en saliva resultan en 5.79 y 19.81 mg/dl, para los grupos control y periodontitis, respectivamente. Por último, los grupos control y gingivitis siguen una distribución no normal de datos, mientras que el grupo de periodontitis sigue una distribución normal de datos, según los valores obtenidos de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Dada la no normalidad de los datos de concentraciones de AS, se aplicó la prueba estadística de Bonferroni para comparar en pares las tres poblaciones. Esta prueba arroja que no es posible diferenciar estadísticamente entre

el grupo de gingivitis y control; pero el grupo de periodontitis resulta estadísticamente diferente al grupo control.

Tabla 7.6: Concentraciones de AS (mg/dl) para los grupos control, gingivitis y periodontitis.

	Control	Gingivitis	Periodontitis
No. pacientes	30	30	33
Concentración de AS (mg/dl)	5.79 ± 2.49 5.98 (3.67 ? 7.76)	12.98 ± 18.06 7.32 (6.21 ? 9.59)	19.81 ± 16.45 17.12 (9.85 ? 21.64)
Valor de ρ (Nivel de significancia $\rho < 0.005$)	$(3,86 \times 10)^{-6}$ (No. Normal)	$(8,06 \times 10)^{-9}$ (No. Normal)	0.50 (Normal)

La Fig. 7.8 muestra la curva ROC para las concentraciones de ácido siálico entre los dos grupos estadísticamente diferentes: periodontitis y grupo de control de pacientes de sólo 63 pacientes del total. Los ejes de la curva ROC se eligen vertical para Sensibilidad (tasa de verdaderos positivos) y horizontal para 1-Especificidad (tasa de falsos positivos). El mejor punto de corte se determinó mediante el índice de Youden [85] que corresponde a concentración de **AS > 12 mg/dl en saliva**. El área bajo la curva ROC es de 88.83 % casi llegando al 100 %, lo que señala que la prueba es buena y este es un resultado muy favorable.

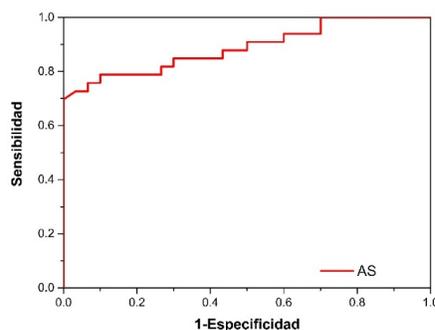


Figura 7.8: Curva ROC de las concentraciones de AS de los grupos control y periodontitis.

El punto de corte seleccionado de la prueba del AS en saliva corresponde a una sensibi-

lidad del 69.69 % y una especificidad del 100 %, para el VPP del 100 % y para el VPN del 75 %. Lo que nos señala que esta prueba puede predecir correctamente al 100 % de certeza que una persona está sana, mientras que el porcentaje baja en cantidad para predecir a una persona enferma, lo cual aunque no es un porcentaje alto, es significativo para esta prueba; el VPP obtiene un magnífico porcentaje del 100 % por lo cual es posible detectar a una paciente enferma cuando se obtenga un resultado positivo de la prueba, en comparación con el valor del 75 % de VPN que nos indica que aunque no es un valor tan alto (entre 90-100 %) es posible tener seguridad para detectar una persona sana cuando obtenga resultado negativo de la prueba (Ver Fig. 7.9, barras rojas). En la Fig. 7.9 también se muestra la comparativa de los porcentajes obtenidos por profundidad del surco gingival y pérdida de inserción clínica publicado por Machtei et al. [26] en 1993 (barras color negro) y Michalowicz et al. [27] en 2013 (barras grises) versus la prueba de AS en saliva (barras color rojo) de 2018.

Se observa que la prueba de AS en saliva en comparación con Machtei et al. y Michalowicz et al. mejora los porcentajes de especificidad, sensibilidad y el valor predictivo positivo y sólo disminuye en el porcentaje del valor predictivo negativo (sólo con respecto a los resultados de Michalowicz et al., de este último valor, a pesar de la disminución se mantiene en un buen rango de porcentaje).

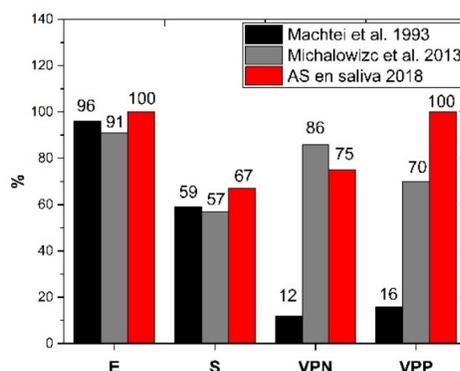


Figura 7.9: Comparación de los datos obtenidos mediante profundidad del surco gingival y pérdida de inserción clínica por Machtei et al. y Michalowicz et al. y la prueba de AS en saliva.

Es importante mencionar que la profundidad del surco gingival y la pérdida de inserción clínica son medidas solo en una visita y después de que ya se tiene la enfermedad y no es suficiente para realizar un diagnóstico activo de la enfermedad [91], por lo cual es importante hacer una detección de que la enfermedad incremente dramáticamente, los clínicos refieren que la profundidad del surco gingival cambia a través del tiempo [27] por lo cual es relevante encontrar una prueba de tamizaje que ayude a detectar oportunamente a las pacientes con mayor riesgo y así evitar pérdidas dentales.

Para la obtención de los porcentajes de E, S, VPN y VPP, se utilizaron los siguientes datos conocidos como Verdadero Positivo (VP), Falso Negativo (FN), Falso Positivo (FP) y Verdadero Negativo (VN).

Resultando en los siguientes porcentajes: VP 36.5 %, FN 15.87 %, FP 0 % y VN 47.61 % del total de la población de mujeres estudiadas. De lo anterior cabe mencionar que al no haber ningún paciente como falso positivo hay certeza de que no se cometerán errores en la detección de la enfermedad periodontal.

Capítulo 8

Conclusiones

La prueba del AS en saliva puede diferenciar significativamente entre lesiones precancerosas de bajo grado (NIC1) y lesiones precancerosas de alto grado (NIC2/3) en conjunto al cáncer cervicouterino invasor (CaCu), así como también entre pacientes sanas y con enfermedad periodontal mostrando excelentes porcentajes de sensibilidad y especificidad (65 y 93 %, respectivamente para el caso de NIC1 y NIC2/3+CaCu; 67 y 100 %, respectivamente para el caso de pacientes sanas y con enfermedad periodontal) comparados con los mostrados en la literatura. El mejor punto de corte de concentración fue de **AS salival >22 mg/dl** para diferenciar entre NIC1 y NIC2/3+CaCu, mientras que para el caso de pacientes sanas y con enfermedad periodontal fue de **AS salival >12 mg/dl**, estos puntos de corte nos indican que la detección de la enfermedad periodontal no causa conflicto con la detección del cáncer cervicouterino, por lo que se rechaza que la enfermedad periodontal pueda ser una variable confusora en la detección de dicho cáncer. Los puntos de corte fueron obtenidos mediante la graficación de la curva ROC con resultados de porcentajes buenos del área bajo la curva (77 y 89 %, respectivamente para los grupos estudiados NIC1 y NIC2/3+CaCu; sanas y periodontitis) con lo cual se demuestra que la prueba de AS salival es buena.

Con los resultados obtenidos se responde a la hipótesis y la pregunta de investigación que señala que hay diferencia en incremento entre las concentraciones de ácido siálico salival de pacientes con diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor (grupo de NIC2/3+CaCu) respecto con las pacientes con lesiones precancerosas (grupo de NIC1, es decir, es mayor la concentración de ácido siálico salival en pacientes a las que ya les ha afectado de manera severa la enfermedad en comparación con las pacientes a las que no les ha afectado tanto; lo mismo sucede con los resultados del grupo entre pacientes sanas y con enfermedad periodontal. De igual manera se cumplieron los objetivos generales, específicos y secundarios de este trabajo de investigación.

La prueba de AS en saliva puede implementarse como herramienta adicional de un método de tamizaje, dicha prueba demuestra ser confiable y efectiva para ser utilizada en la detección de lesiones precancerosas del cáncer cervicouterino como también en enfermedad periodontal, así mismo puede competir con sus métodos actuales homólogos como son el Frotis de Papanicolaou y pérdida de inserción clínica (CAL), respectivamente para los grupos estudiados. Las ventajas que muestra esta prueba incluyen la no invasividad de la extracción de la muestra a estudiar y evita a toda costa la subjetividad del análisis por lo que se espera que la detección salival como lo es esta prueba de AS sea implementada ampliamente para ayudar a la población en riesgo.

Nuestro trabajo muestra que la incorporación novedosa de la técnica SERS producida por AgNPs para la determinación del AS en saliva es una técnica de bajo costo, reproducible, segura y puede realizarse en tiempo real, a diferencia de otros métodos de determinación que utilizan demasiados reactivos, que son excesivamente costosos y de resultados prolongados. Una de las limitaciones que tuvo este trabajo de investigación fue el número de pacientes estudiadas por lo que en un futuro se buscará ampliar dicho número. Por último, la prueba de AS en saliva es una excelente herramienta adicional para tamizaje ya que se obtuvo que tiene una tasa baja de falsos positivos, por lo que se espera que en un futuro se pueda incluir como método de detección temprana.

Apéndice A

Glosario

- Ag: Plata
- AgNP: Nanopartícula de plata (plural, AgNPs)
- AS: Ácido siálico
- Au: Oro
- CAL: Pérdida de inserción clínica
- CBL: Citología en Base Líquida
- CCD: Dispositivo de carga acoplada
- Cu: Cobre
- DFT: Teoría de funciones de la densidad
- DLS: Dispersión de Luz Dinámica
- E: Especificidad
- EM: Campo electromagnético

- FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
- IgA: Inmunoglobulina A
- IC: Intercuartil
- IVAA: Inspección Visual de Ácido Acético
- LEI: Lesión Escamosa Intraepitelial
- LSP: Plasmones de superficie localizada
- LSPR: Plasmón de resonancia superficial localizada
- NA: Apertura numérica
- Neu5Ac: Ácido N-acetilneuramínico
- NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervicouterina (plural, NICs)
- NIC1: Neoplasia Intraepitelial de bajo grado
- NIC2, NIC3: Neoplasia Intraepitelial de alto grado
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- Pap: Frotis de Papanicolaou
- ROC: Curva característica operativa del receptor
- S: Sensibilidad
- SEM: Microscopía Electrónica de Barrido
- SERS: Dispersión Raman Amplificada por Superficie
- SPP: Polaritones de plasmón superficial

- UV-Vis: Ultravioleta-visible
- VPH: Virus del Papiloma Humano
- VPN: Valor Predictivo Negativo
- VPP: Valor Predictivo Positivo

Apéndice B

Publicaciones, Congresos y Estancias

- Presentación del póster “Study on the application of Raman Spectroscopy for early detection of cervical cancer” en el XI International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum que se llevó a cabo en Playa del Carmen, México del 24-28 de septiembre de 2018.
- Publicación del artículo: Zermeño-Nava, J., Martínez-Martínez, M., Ramírez-de-Ávila, A., Hernández-Arteaga, A., García-Valdivieso, M., Hernández-Cedillo, A., José-Yacamán, M. and Navarro-Contreras, H. (2018). Determination of sialic acid in saliva by means of surface-enhanced Raman spectroscopy as a marker in adnexal mass patients: ovarian cancer vs benign cases. *Journal of Ovarian Research*.
- Estancia en el Centro de Investigaciones en Óptica (CIO) de la Ciudad de León, Guanajuato en el taller de Biofotónica Aplicada que se llevó a cabo del 18 al 22 de septiembre de 2017.

Apéndice C

1. Aprobación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de S.L.P



San Luis Potosí, S.L.P., a 22 de enero de 2018

Ing. Alondra Hernández Cadillo
Investigador Principal:

Por este medio se le comunica que su protocolo de investigación titulado “Comparación de la concentración en el ácido siálico en saliva en un grupo piloto entre mujeres diagnosticadas con lesiones benignas y mujeres con diagnóstico de cáncer cervicouterino Invasor”, fue evaluado por el Comité de Investigación, con Registro en COFEPRIS 17 CI 24 028 093, así como por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución con Registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427, y fue dictaminado como:

APROBADO

El número de registro es 02-18, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a ambos comités.

De igual forma pido sea tan amable de comunicar a los Comités de Investigación y de Ética en Investigación: la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe final pertinente.

*Se le recuerda que todos los pacientes que participen en el estudio deben firmar la versión sellada del formato de consentimiento informado.

Atentamente


Dra. M. Del Mar González Leal
Sub-Directora de Educación e Investigación en Salud
Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”



C.C.P. Archivo

Apéndice D

1.1 Aprobación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de S.L.P



San Luis Potosí, S.L.P., a 22 de enero de 2018

Ing. Alondra Hernández Cacillo
Investigadora Principal
CICAYT, JASLP
PRESENTE.

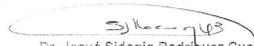
Estimada Investigadora:

Por este conducto se le comunica que el protocolo de investigación titulado “Comparación de la concentración en el ácido siálico en saliva en un grupo piloto entre mujeres diagnosticadas con lesiones benignas y mujeres con diagnóstico de cáncer cervicouterino Invasor”, fue evaluado por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución, con registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427. El dictamen para este protocolo fue el siguiente:

APROBADO

El Investigador principal deberá comunicar a este Comité la fecha de inicio y término del proyecto, y presentar el informe final correspondiente. Asimismo, el Comité de Ética e Investigación podrá solicitar información al investigador principal referente al avance del protocolo en el momento que considere pertinente.

Atentamente,


Dr. Josué Sidonio Rodríguez Cuevas
Presidente del Comité de Ética en Investigación
Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”



c.p.p. Archivo. Subdirección de Educación e Investigación, Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Av. Venustiano Carranza No. 2395
Zona Universitaria
San Luis Potosí, S.L.P. C.P. 78290
Tel: 01 (444) 558-10-00
www.hospitalcentral.gob.mx
www.slp.gob.mx

Apéndice E

2. Aprobación del Comité de Ética e Investigación para la Salud del “Hospital General de Ciudad Valles”, Cd. Valles, S.L.P



SSLP SERVICIOS DE SALUD
PROGRESAMOS JUNTOS

AREA: _____ HOSPITAL GENERAL
DEPARTAMENTO: EDUCACION E INVESTIGACION EN SALUD
DOMICILIO: CARR. MEXICO LAREDO SUR FRACC. OXITIPA
NUMERO DE OFICIO _____
EXPEDIENTE 16S.2 _____

Asunto: Dictamen de Protocolo # de registro: 26/2018

Ciudad Valles, S.L.P. 05 OCT 2018

DR. HUGO RICARDO NAVARRO CONTRERAS
COORDINADOR GENERAL DEL CIACYT
DE SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

Informo a usted que con fecha 02 de Octubre de 2018, el Comité de Ética e Investigación para la salud (CEI), de este Hospital realizó la evaluación del protocolo de investigación:

INSTITUCION	TITULO:	RESPONSABLE
UASLP	"Comparación de la concentración en el ácido siálico en saliva en un grupo piloto entre mujeres diagnosticadas con lesiones benignas y mujeres con diagnóstico de cáncer cervicouterino"	Ing. Alondra Hernández Cedillo

Siendo el dictamen por consenso de la comisión el emitir.

OPINION TECNICA FAVORABLE (APROBADO)

Lo anterior con fundamento en el TITULO QUINTO de la ley Estatal de Salud, que establece las bases, condiciones y normatividad en materia de investigación para la salud.

Considerando lo anterior, deberá presentar avances de su proyecto y resultados a esta comisión.

ATENTAMENTE
EL DIRECTOR DEL HOSPITAL

DR. CHRISTIAN ALEMAN MUÑIZ

MSPC/ALPR/mcaz



Carr. México-Laredo sur esq. Angel Oliva, Fracc. Oxitipa, Ciudad Valles, S.L.P.
Tel: 01 (481) 38 2 81 70 Ext. 25 131 y 25 164
E-mail: hospital_valles@hotmail.com
eduvalles9@hotmail.com

AL CONTESTAR ESTE OFICIO CITENSE LOS DATOS
CONTENIDOS EN EL ANGLULO SUPERIOR DERECHO

Apéndice F

3. Aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología de la UASLP


UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Av. Manuel Nava # 2, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.
Tels. 826-73-57 y 58, Fax: 813-97-43

San Luis Potosí, S.L.P., 20 de enero de 2018

PASANTE DE M.E. ABIGAIL RODRÍGUEZ BRIANO
DOCTORADO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA, UASLP
P R E S E N T E

Estimada Pasante de M.E. Rodríguez Briano

Por este conducto me dirijo a Usted en referencia a su trabajo de investigación titulado "*Identificación de la enfermedad periodontal en mujeres de 30 a 60 años de edad*" asignado con la clave: CEI-FE-001-018.

Dicho trabajo fue evaluado en los **aspectos del marco ético-legal y bioseguridad** por los miembros del H. Comité de Ética en Investigación: Dra. Yolanda Hernández Moliner, Dra. Norma Verónica Zavala Alonso, Dra. Claudia Edith Dávila Pérez, Dra. Rita Elizabeth Martínez Martínez, Dr. José Arturo Garrocho Rangel, Dr. Oscar Sánchez Armase Capello, Dr. Victor Mario Fierro Serna y M.C. Ana María González Amaro. De dicha evaluación y de forma colegiada, el Comité ha dictaminado que su protocolo de investigación es **APROBADO POR UNANIMIDAD** pudiendo llevarlo a cabo en los tiempos que Usted considere necesarios para la ejecución del mismo.

El Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología se rige con la clave **CONBIOÉTICA24CEI01320150526** de acuerdo con las directrices nacionales para la integración y funcionamiento de los Comités de Ética e Investigación emitidas por la CONBIOÉTICA, con vigencia de 28 mayo 2015 - 25 mayo 2016.

Le solicitamos nos haga llegar los informes correspondientes del avance de su proyecto de investigación, así como un informe final para nuestro archivo, recordándole además que este proyecto podrá ser monitoreado por este Comité.

ATENTAMENTE


M.C. ANA MARÍA GONZÁLEZ AMARO
PRESIDENTA DEL H. COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA, UASLP


FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
Av. Dr. Manuel Nava 2
Zona Universitaria - CP 76209
San Luis Potosí, S. L. P., México
tel. +52 (446) 826 2360
ext. 5179 y 9121
(446) 813 9743, 834 2522, 23 y 25
www.estomatologia.uaslp.mx
cei@estomatologia.uaslp.mx

Apéndice G

Ejemplo de Carta de Consentimiento Informado



Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"
Comité de Ética en Investigación

Título: "Comparación de la concentración en el ácido siálico en saliva en un grupo piloto entre mujeres diagnosticadas con lesiones precancerosas y mujeres con diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor"

San Luis Potosí, S.L.P.

Fecha: _____

Clave de ID del paciente: _____

Información para el paciente

El cáncer es una enfermedad en la cual las células en el cuerpo se multiplican sin control. Cuando este comienza en el cuello del útero, se llama cáncer cervicouterino. El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo. La mayoría de esas defunciones ocurren en países de ingresos bajos y medianos. La causa primaria de las lesiones precancerosas y del cáncer cervicouterino es la infección persistente o crónica por uno o más de los tipos "de alto riesgo" (u oncógenos) de virus del papiloma humano (VPH).

El Departamento de Cirugía General del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" realiza la presente investigación en colaboración con el Departamento del Centro de Aplicación de la Radiación Infrarroja, Energías Alternativas y Materiales (CARIEM) en la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT), de la UASLP, con el objetivo de determinar la concentración de ácido siálico, en mujeres diagnosticadas con lesiones precancerosas y con cáncer cervicouterino invasor. El ácido siálico es una sustancia presente en la saliva de las personas de manera normal, pero puede modificar su presencia cuando la persona tienen alguna enfermedad, como el cáncer.

Este estudio se realizará en las instalaciones de este hospital en el área de Ginecología y Obstetricia a partir de la fecha / / y se incluirá a 60 pacientes mayores de edad que participarán una sola ocasión durante su estancia en el hospital. El estudio se realizará durante los siguientes 6 meses en los que se invitará a todas las pacientes que tengan el diagnóstico de lesiones precancerosas y de cáncer cervicouterino invasor.

Procedimientos

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque fue diagnosticado con este padecimiento. Si usted acepta participar en el estudio de investigación, le pediremos que lea cuidadosamente el presente documento de consentimiento informado y que haga todas las preguntas necesarias al investigador responsable, la Ing. Alondra Hernández Cedillo, para que pueda resolver sus dudas. Cuando ya no tenga alguna duda con respecto a lo que se hará en este estudio, le pediremos que firme su aceptación de participar, al final de este documento y nos de su autorización para poder revisar su expediente clínico y recabar información necesaria en un cuestionario para completar esta

Ejemplo de Carta de Consentimiento Informado

investigación, como su edad, peso, si padece alguna enfermedad, si toma medicamentos, fuma o consume otro tipo de drogas, los datos referentes a los estudios que se le han realizado, los análisis de laboratorio y/o las cirugías que se le harán de ser necesario, como parte de su diagnóstico y tratamiento.

Si usted acepta participar en el estudio le pediremos que nos otorgue una muestra de saliva, para la cual, previamente debe realizarse un lavado de dientes con cepillo y pasta dental, posterior al cepillado se harán gárgaras por 30 segundos con un enjuague bucal, que se le proporcionarán de manera gratuita y que no le generarán ningún costo. Una vez finalizado este proceso se recolectará hasta 1.5mL de saliva en el recipiente proporcionado previamente etiquetado con sus datos, esta cantidad equivale a una cucharada pequeña.

La muestra de saliva se analizará en el laboratorio de Energías Renovables del Departamento del Centro de Aplicación de la Radiación Infrarroja, Energías Alternativas y Materiales (CARIEM) en la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT) para determinar la cantidad de concentración presente del ácido siálico en la saliva.

Beneficios:

Usted no recibirá un beneficio directo o inmediato. Sin embargo, estará colaborando con esta institución de salud y ayudará a que las personas que padecen su misma enfermedad, en un futuro próximo puedan ser diagnosticadas o complementar su diagnóstico utilizando esta sustancia en la saliva, para ser tratadas de manera más eficiente y se pueda pronosticar como se desarrollará su enfermedad.

Potenciales riesgos/compensación:

Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Sólo deberá tener cuidado en que el cepillado de dientes no sea tan fuerte o agresivo para evitar sangrado en las encías. El personal que realiza el estudio está altamente capacitado para realizar la toma de la muestra de saliva y para explicarle cualquier duda que usted tenga en cualquier momento durante su participación.

Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio y tampoco le generará ningún costo. Se le entregará una copia del presente documento.

Participación o retiro:

Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria y usted ha sido seleccionada debido a las características de su cuadro clínico, es decir, de los síntomas y resultados de los análisis y estudios que se le han realizado para diagnosticar su enfermedad.

Usted está en la libertad de negarse a participar en este estudio de investigación; pero si decide participar, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, usted puede revocar o anular el consentimiento que ahora firma. Su decisión de participar o no, no afectará de ninguna forma el trato médico que reciba en la institución para su enfermedad.

Privacidad y confidencialidad:

La información personal y médica que usted proporcione para este estudio será de carácter estrictamente confidencial y será utilizada únicamente por el equipo de investigación de este proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Esta información se conjuntará con la de otros participantes para realizar el presente estudio. Con la finalidad de mantener el anonimato, se le asignará un código para el uso de sus datos.

Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero los datos clínicos de todas las participantes se presentarán de forma anónima y de tal manera que usted o cualquiera de las pacientes que participen en este estudio no podrán ser identificadas.

Existen instituciones u organismos mexicanos como la Secretaría de Salud, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos sanitarios (COFEPRIS), la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOETICA) o incluso el Comité de Ética en Investigación (CEI) de este hospital, que se encargan de vigilar el buen manejo de sus muestras y de los datos personales y médicos que usted y los demás pacientes han autorizado para que sean utilizados en la realización de estudios de investigación como el presente. Estas instituciones u organismos pueden solicitar en cualquier momento a los investigadores de este estudio, la revisión de los procedimientos que se realizan con su información y con sus muestras, con la finalidad de verificar que se haga un uso correcto y ético de los mismos; por lo que podrán tener acceso a esta información que ha sido previamente asignada con un código de identificación, cuando así lo requieran.

Manejo del material biológico.

Las muestras de saliva obtenidas serán procesadas para medir las concentraciones de la sustancia llamada ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico). Después de terminado el estudio serán destruidas de acuerdo con la norma NOM-013-SSA2-1984 para la disposición final de los residuos salivares y ya no podrán ser utilizadas para cualquier otro fin.

Todo el material biológico obtenido de sus muestras para este estudio se utilizará únicamente para los propósitos explicados en este documento de consentimiento informado y no se utilizarán para aislar material genético, para realizar cultivos de sus células de forma temporal o permanente y/o para realizar cambios en el material genético de sus células (líneas celulares continuas, transformadas o inmortalizadas). Asimismo, en ninguna circunstancia sus muestras podrán ser analizadas con motivos de identificación.

Todo el material biológico será destruido al finalizar este estudio.

Los investigadores, médicos tratantes, estudiantes o cualquier otra persona relacionada con este proyecto no podrán comercializar, donar o intercambiar alguna de las muestras que usted ha consentido en donar para los propósitos descritos en este documento.

Cualquier estudio posterior derivado de este proyecto y que los investigadores responsables requieran realizar la muestra que usted ha consentido en donar o con sus datos médicos y que no esté relacionado con los objetivos específicos descritos en este documento de consentimiento informado, deberá ser notificado al Comité de Ética en

Ejemplo de Carta de Consentimiento Informado

Investigación del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" de San Luis Potosí, S.L.P. para que sea evaluado y de ser el caso si así lo juzga pertinente, sea aprobado para su realización

Datos de contacto:

Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese en cualquier momento con las siguientes personas:

Ing. Alondra Hernández Cedillo

Investigador responsable

Departamento de CARIEM

Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT)

Av. Sierra Leona 550,

Col. Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78210

Tel. 8262300 Ext. 8445

Si usted tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como participante en el estudio de investigación, también puede ponerse en contacto con una persona no involucrada con el equipo de investigadores de este estudio:

Dr. Josué Sidonio Rodríguez Cuevas

Presidente del Comité de Ética en Investigación

Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

Av. Venustiano Carranza 2395,

Col. Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78290,

Tel (52-444) 8 34 27 01, Ext. 1710

Aceptación del documento de Consentimiento Informado

Si usted desea participar de manera voluntaria en esta investigación, por favor proporcione su nombre, firma y fecha en este documento en los espacios proporcionados en la parte inferior. Su firma significa que usted acepta lo siguiente:

1. Se me ha dado la información completa y adecuada en forma verbal y por escrito sobre el objetivo del estudio y me han explicado los riesgos y beneficios de participar en lenguaje claro.

2. Se me ha informado que puedo retirar mi consentimiento y terminar mi participación en este estudio en cualquier momento sin afectar mi derecho a recibir atención médica.

3. Es mi responsabilidad preguntar para aclarar cualquier punto que no entienda en relación con mi participación en este estudio. He hecho todas las preguntas a la persona que realiza el proceso de consentimiento y he recibido respuestas satisfactorias.

4. No he ocultado o distorsionado cualquier condición médica actual o cualquier antecedente médico relacionado con mi salud. He respondido todas las preguntas en relación con mi salud en forma precisa y verdadera.

5. Soy mayor de edad y legalmente capaz de dar este consentimiento.

6. Acepto participar en este estudio de manera libre y voluntaria sin que me hayan presionado u obligado. Entiendo que mi negación a participar o la discontinuación de mi participación en cualquier momento, no implicará penalidad o pérdida de beneficios a los que de otra forma tengo derecho.

7. Entiendo y estoy de acuerdo en que la información obtenida a partir del presente estudio puede ser utilizada para la publicación de estos resultados como parte de la divulgación científica y como apoyo a la práctica clínica, pero que en todo momento se utilizara un código asignado para mantener mi anonimato y la confidencialidad de mis datos.

8. Me han explicado que la información personal y clínica que he consentido en proporcionar conservará mi privacidad y que se utilizará solo para los fines que deriven de este estudio. Los datos relacionados con mi privacidad familiar serán manejados en forma confidencial ya que se utilizará un código asignado para mantener mi anonimato y la confidencialidad de todos los datos.

9. Los investigadores que participan en este proyecto se han comprometido a proporcionarme la información actualizada que pueda ser importante para mi salud y que se obtenga durante el estudio en el momento en el que lo solicite y me entregarán una copia de este documento de consentimiento informado.

Autorización para el acceso al expediente clínico del paciente y uso de datos clínicos

Se le solicita que indique su acuerdo o desacuerdo para que los investigadores responsables de este proyecto puedan revisar su expediente clínico y utilizar los datos clínicos que se encuentran descritos en el mismo, de manera anónima para este protocolo de investigación, cuyos objetivos y procedimientos se le han explicado. Marque con una X su respuesta:

____ Sí, doy mi autorización a los investigadores que participan en este proyecto para el uso de los datos en mi expediente clínico en la investigación que me han explicado.

____ No doy mi autorización a los investigadores que participan en este proyecto para el uso de los datos en mi expediente clínico en la investigación que me han explicado.

Por medio del presente documento de consentimiento informado acepto participar en el estudio de investigación denominado "Comparación de la concentración en el ácido siálico en saliva en un grupo piloto entre mujeres diagnosticadas con lesiones

Ejemplo de Carta de Consentimiento Informado

precancerosas y mujeres con diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor” de manera libre y voluntaria.

_____ Nombre del paciente	_____ Firma del paciente
_____ Fecha	
_____ Nombre del representante legal (si es necesario)	_____ Firma del representante legal
_____ Fecha	_____ Dirección o teléfono de contacto
_____ Nombre del Testigo 1	_____ Firma del Testigo 1
_____ Fecha	_____ Dirección o teléfono de contacto
_____ Parentesco	
_____ Nombre del Testigo 2	_____ Firma del Testigo 2
_____ Fecha	_____ Dirección o teléfono de contacto
_____ Parentesco	

Dr. José de Jesús Zermeño Nava
Responsable del estudio
Departamento de Ginecología y Obstetricia
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"
Cédula profesional 4099400

Apéndice H

4. Hoja de recolección de datos para ambos hospitales



HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA AMBOS HOSPITALES

"COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EN EL ACIDO SIÁLICO EN SALIVA EN UN GRUPO PILOTO ENTRE MUJERES DIAGNOSTICADAS CON LESIONES PRECANCEROSAS Y MUJERES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER CERVICOUTERINO INVASOR"

Clave I.D. del paciente _____

Nombre: _____

Edad: _____ Peso: _____ Estatura: _____

Domicilio: _____

Teléfono: _____ Ocupación: _____

¿Padece de alguna(s) enfermedad(es)?: Sí No

¿Cuál(es)?: _____

Apéndice I

4.1 Hoja de recolección de datos para ambos hospitales

¿Toma algún(os) medicamento(s)? Sí No

¿Cuál(es)?: _____

¿Padece de problemas bucales (caries, aftas, etc.)? Sí No

¿Cuál(es)?: _____

¿Fuma Actualmente? Sí No

¿Consume drogas? Sí No

¿Tiene antecedente familiar de cáncer cervicouterino? Sí No

Observaciones:

Bibliografía

- [1] OMS/OPS, “Pruebas de detección temprana de cáncer cervicouterino” *El Virus del Papiloma Hum. y el Cáncer Cervicouterino*, vol. CUARTA ed, pp. 1-4, 2015.
- [2] World Health Organization, *Control Integral del Cáncer Cervicouterino*. 2007.
- [3] A. Hernández-Arteaga *et al.*, “Diagnosis of breast cancer by analysis of sialic acid concentrations in human saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles”, *Nano Res.*, vol. 10, no. 11, pp. 3662-3670, 2017.
- [4] J. G. de la Garza-Salazar, F. Morales-Vasquez, and A. Meneses-García, *Cervical Cancer*. 2017.
- [5] L. H. Sobin and C. Wittekind, “Cervix Uteri”, *TNM Online*, vol. 876, pp. 6-7, 2003.
- [6] “Mexico Source: Globocan 2018.”
- [7] D. M. Hernández-Hernández *et al.*, “Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino”, *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, vol. 53, no. 2, pp. 154-61, 2015.
- [8] “tratamiento-cancer-cervicouterino-vph - SegundoMédico.” [Online]. Available: <https://www.segundomedico.com/vacuna-contracancer-cuello-utero/tratamiento-cancer-cervicouterino-vph/>. [Accessed: 22-Jan-2019].
- [9] E. L. Franco, E. Duarte-Franco, and A. Ferenczy, “Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection.”, *Can. Med. Assoc.*, vol. 164, no. 7, pp. 1017-1025, 2001.
- [10] G. M. Esquivel *et al.*, “Cáncer Cervicouterino”, *ONCO GUÍA Cáncer Cervicouterino*, vol. 22, no. Cáncer Cervicouterino, pp. 62-66, 2011.

- [11] “Cervical cancer In Situ analysis.” [Online]. Available: <http://kurusteleonapat.blogspot.com/2018/01/cervical-cancer-in-situ-analysis.html>. [Accessed: 09-Feb-2019].
- [12] L. Jungner, I. Jungner, M. Engvall, and U. von Döbeln, “Gunnar Jungner and the Principles and Practice of Screening for Disease”, *Int. J. Neonatal Screen.*, vol. 3, no. 3, p. 23, 2017.
- [13] “Aberrant_sialylation_and_fucos.PDF.”
- [14] B. J.D., E. B.K., and H. W.K., “New insights into cervical cancer screening”, *J. Gynecol. Oncol.*, vol. 23, no. 4, pp. 282-287, 2012.
- [15] M. U. Barut *et al.*, “Analysis of Sensitivity, Specificity, and Positive and Negative Predictive Values of Smear and Colposcopy in Diagnosis of Premalignant and Malignant Cervical Lesions”, *Med. Sci. Monit.*, vol. 21, pp. 3860-3867, 2015.
- [16] N. Rojo Botello, A. Flores Espinosa, and M. Arcos-Castro, “Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica”, *Rev. Odontol.*, vol. 15, no. 1, pp. 31-39, 2011.
- [17] J. Kim and S. Amar, “Periodontal disease and systemic conditions: A bidirectional relationship”, *Odontology*, vol. 94, no. 1, pp. 10-21, 2006.
- [18] S. A. Patel and J. A. Barros, *Introduction*. 2015.
- [19] “En México, la enfermedad periodontal tiene una prevalencia de 70 por ciento”. [Online]. Available: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_476.html. [Accessed: 07-Jan-2019].
- [20] V. Epidemiol, “Sivepab-2015”, *Bol. Epidemiol.*, vol. 1, no. 1, p. 1, 2015.
- [21] M. S. Colin B. Wiebe, DDS and P. Edward E. Putnins, DDS, “of the American Academy of Periodontology”, *J Can Dent Assoc* 2000; 66594-7, pp. 594-597, 1999.
- [22] J. I. Jawzali, “Association between salivary sialic acid and periodontal health status among smokers”, *Saudi Dent. J.*, vol. 28, no. 3, pp. 124-135, 2016.
- [23] A. S. A. Alsada, “Elevated Levels Of Salivary Sialic Acid In Periodontitis Disease”, vol. 40. pp. 736-741, 2010
- [24] M. Shinohara, K. Ohura, K. Ogata, H. Inoue, T. Miyata, and M. Yoshioka, “The relationship between the sialic acid concentrations in the serum and whole saliva in rats with naturally occurring gingivitis”, *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 64, no. 1, pp. 61-63, 1994.

- [25] R. Pérez, “Prevalencia y severidad de enfermedad periodontal crónica en adolescentes y adultos”, *Oral*, vol. 12, no. 39, pp. 799-804, 2011.
- [26] E. E. Machtei *et al.*, “Alternative methods for screening periodontal disease in adults”, *J. Clin. Periodontol.*, vol. 20, no. 2, pp. 81-87, 1993.
- [27] B. S. Michalowicz, J. S. Hodges, and B. L. Pihlstrom, “Is change in probing depth a reliable predictor of change in clinical attachment loss?”, *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 144, no. 2, pp. 171-178, 2013.
- [28] B. Singh *et al.*, “Application of vibrational microspectroscopy to biology and medicine”, *Curr. Sci.*, vol. 102, no. 2, pp. 232-244, 2012.
- [29] I. M. Ochando, “Espectroscopía Raman: Fundamentos Y Aplicaciones”, *no. August 2015*, 2016.
- [30] M. Baia, S. Astilean, and T. Iliescu, *Raman and SERS investigations of pharmaceuticals*. 2008.
- [31] M. Bańkowska, J. Krajczewski, I. Dziecielewski, A. Kudelski, and J. L. Weyher, “Au-Cu alloyed plasmonic layer on nanostructured GaN for SERS application”, *J. Phys. Chem. C*, vol. 120, no. 3, pp. 1841-1846, 2016.
- [32] J. F. Li, Y. J. Zhang, S. Y. Ding, R. Panneerselvam, and Z. Q. Tian, “Core-shell nanoparticle-enhanced raman spectroscopy”, *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 7, pp. 5002-5069, 2017.
- [33] L. Yang *et al.*, “SERS strategy based on the modified Au nanoparticles for highly sensitive detection of bisphenol A residues in milk”, *Talanta*, vol. 179, no. August 2017, pp. 37-42, 2018
- [34] Q. Fu *et al.*, “Rough surface Au@Ag core-shell nanoparticles to fabricating high sensitivity SERS immunochromatographic sensors”, *J. Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 1, pp. 1-9, 2015.
- [35] A. B. Zrimsek *et al.*, “Single-Molecule Chemistry with Surface- and Tip-Enhanced Raman Spectroscopy”, *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 11, pp. 7583-7613, 2017.
- [36] A. C. Hernández-Arteaga *et al.*, “Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Acetil-neuraminic Acid on Silver Nanoparticles: Role of the Passivating Agent on the Adsorption Efficiency and Amplification of the Raman Signal”, *J. Phys. Chem. C*, vol. 121, no. 38, pp. 21045-21056, 2017.

- [37] L. A. Lane, X. Qian, and S. Nie, "SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging", *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 19, pp. 10489-10529, 2015.
- [38] Y. Yuan et al., "SERS-based ultrasensitive sensing platform: An insight into design and practical applications", *Coord. Chem. Rev.*, vol. 337, pp. 1-33, 2017.
- [39] R. Deng et al., "Glucose-bridged silver nanoparticle assemblies for highly sensitive molecular recognition of sialic acid on cancer cells via surface-enhanced raman scattering spectroscopy", *Talanta*, vol. 179, no. November 2017, pp. 200-206, 2018.
- [40] B. Sharma, R. R. Frontiera, A. I. Henry, E. Ringe, and R. P. Van Duyne, "SERS: Materials, applications, and the future", *Mater. Today*, vol. 15, no. 1-2, pp. 16-25, 2012.
- [41] E. Vinogradova, A. Tlahuice-Flores, J. J. Velazquez-Salazar, E. Larios-Rodriguez, and M. Jose-Yacamán, "Surface-enhanced Raman scattering of N-acetylneuraminic acid on silver nanoparticle surface", *J. Raman Spectrosc.*, vol. 45, no. 9, pp. 730-735, 2014.
- [42] J. L. González-Solís et al., "Aplicaciones de la técnica de espectroscopia Raman de superficie amplificada en el diagnóstico del cáncer basado en el análisis de muestras de suero sanguíneo", *Ide@s CONCYTEG*, vol. 7, no. 87, pp. 1091-1100, 2012.
- [43] T. Zhang, Z. She, Z. Huang, J. Li, X. Luo, and Y. Deng, "Application of sialic acid/polysialic acid in the drug delivery systems", *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 75-81, 2014.
- [44] F. G. BLIX, A. GOTTSCHALK, and E. KLENK, "Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids", *Nature*, vol. 179, no. 4569, p. 1088, May 1957.
- [45] R. Schauer, "Chemistry and Biology of the Acylneuraminic Acids", *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 12, no. 2, pp. 127-138, 1973.
- [46] B. Wang and J. Brand-Miller, "The role and potential of sialic acid in human nutrition", *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 57, no. 11, pp. 1351-1369, 2003.
- [47] L. V. Belskaya, V. K. Kosenok, and Z. Massard, "Sialic Acids of Saliva in Primary and Differential Diagnosis of Lung Cancer", *Sovrem. Tehnol. v Med.*, vol. 10, no. 2, p. 110, 2018.

- [48] S. Narayanan, "Sialic acid as a tumor marker", *Ann. Clin. Lab. Sci.*, vol. 24, no. 4, pp. 376-384, 1994.
- [49] T. Aetiology, "Poster Abstracts", *Mycoses*, vol. 55, no. SUPPL.4, pp. 95-338, 2012.
- [50] A. S. Of et al., "Original Research Article A STUDY OF TOTAL SIALIC ACID AND LIPID BOUND SIALIC ACID LEVELS AND TOTAL SIALIC ACID TO Original Research Article", vol. 6, no. 22, pp. 1778-1783, 2017.
- [51] P. Sillanaukee, M. Pönniö, and I. P. Jääskeläinen, "Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders", *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 29, no. 5, pp. 413-425, 1999.
- [52] I. Vivas, L. Spagnuolo, and P. Palacios, "Total and lipid-bound serum sialic acid as markers for carcinoma of the uterine cervix", *Gynecol. Oncol.*, vol. 46, no. 2, pp. 157-162, 1992.
- [53] O. Article, "Status of Sialic Acid in Patients With Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Carcinoma", vol. 10, no. 3, pp. 2375-2378, 2010.
- [54] E. Emekli-Alturfan, A. Yarat, E. Caliskan-Ak, R. Pisiriciler, B. Kuru, and Ü. Noyan, "Determination of storage time of saliva samples obtained from patients with and without chronic periodontitis for the comparison of some biochemical and cytological parameters", *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 27, no. 4, pp. 261-266, 2013.
- [55] S. R. Rathod, F. Khan, A. P. Kolte, and M. Gupta, "Estimation of salivary and serum total sialic acid levels in periodontal health and disease", *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 8, no. 9, pp. ZC19-ZC21, 2014.
- [56] A. S. A. Alsada, "Elevated Levels Of Salivary Sialic Acid In Periodontitis Disease", vol. 40, pp. 736-741, 2010.
- [57] C. L. Puy, "La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías", *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, vol. 11, pp. E449-55, 2006.
- [58] "Influence of saliva on the oral microbiota", vol. 70, no. 97, pp. 80-92, 2016.
- [59] T. Pfaffe, J. Cooper-White, P. Beyerlein, K. Kostner, and C. Punyadeera, "Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications", *Clin. Chem.*, vol. 57, no. 5, pp. 675-687, 2011.
- [60] I. D. Mandel, "The diagnostic uses of saliva", *J. Oral Pathol. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 119-125, 1990.

- [61] J. D. J. Zermeño-nava, M. U. Martínez-martínez, A. L. Ramírez-de-ávila, A. C. Hernández-arteaga, M. G. García-valdivieso, and A. Hernández-cedillo, "Determination of sialic acid in saliva by means of surface-enhanced Raman spectroscopy as a marker in adnexal mass patients: ovarian cancer vs benign cases", pp. 1-9, 2018.
- [62] J. Liu and Y. Duan, "Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring", *Oral Oncol.*, vol. 48, no. 7, pp. 569-577, 2012.
- [63] Y. Zheng et al., "Electrochemical Determination of Salivary N-Acetylneuraminic Acid by Miniaturized Capillary Electrophoresis Coupled with Sample Stacking", *Chinese J. Chem.*, vol. 34, no. 9, pp. 925-930, 2016.
- [64] H. G. H. & B. M. A. Jwan I. Jawzaly, "RELATIONSHIPS OF SALIVARY SIALIC ACID AND ITS FRACTION IN PERIODONTITIS WITH DEMOGRAPHIC PROPERTIES AND MEDICAL HISTORY", *Int. J. Dent. Res. Dev.*, vol. 3, no. 2, pp. 17-26, 2013.
- [65] E. Kaufman and I. B. Lamster, "Analysis of saliva for periodontal diagnosis: A review", *J. Clin. Periodontol.*, vol. 27, no. 7, pp. 453-465, 2000.
- [66] J. I. Jawzali, "Association between salivary sialic acid and periodontal health status among smokers", *Saudi Dent. J.*, vol. 28, no. 3, pp. 124-135, 2016.
- [67] J. Seoane Lestón and P. Diz Dios, "Diagnostic clinical aids in oral cancer", *Oral Oncol.*, vol. 46, no. 6, pp. 418-422, 2010.
- [68] Z. Abu Hassan, P. Schattner, and D. Mazza, "Academy of Family Physicians of Malaysia Research Notes DOING A PILOT STUDY: WHY IS IT ESSENTIAL?", *Malaysian Fam. Physician*, vol. 1, no. 2, pp. 2-3, 2006.
- [69] Web-EPS, "Estudios EPS", vol. 32, no. 1, pp. 26-34, 2016.
- [70] L. Buendía, P. Colás, and F. Hernández, "El texto siguiente está sacado de un capítulo del libro cuya referencia bibliográfica es la siguiente: Buendía, L.; Colás, P. y Hernández, F. (2001):", *Métodos Investig. en Psicopedag.*, pp. 1-7, 2001.
- [71] Secretaría de Salud, "Ley General de Salud", *D. Of. la Fed.*, pp. 1-135, 1992.
- [72] Congreso del Estado de San Luis Potosí, "Ley de Salud del Estado de San Luis Potosí [PO 15 marzo 2017]", p. 103, 2004.
- [73] "DOF - Diario Oficial de la Federación". [Online]. Available: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013. [Accessed: 20-Sep-2018].

- [74] “MODIFICACIÓN A LA NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-013-SSA2-1994, PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES BUCALES”. [Online]. Available: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m013ssa24.html>. [Accessed: 20-Sep-2018].
- [75] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hiller, “A Study of the Nucleation and Growth Processes IN the Synthesis of Colloidal Gold”, *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, no. c, pp. 55-75, 1951.
- [76] L. Cheng, C. Ma, G. Yang, H. You, and J. Fang, “Hierarchical silver mesoparticles with tunable surface topographies for highly sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy”, *J. Mater. Chem. A*, vol. 2, no. 13, pp. 4534-4542, 2014.
- [77] B. Motion, “Intro_To_Dls”, pp. 1-8.
- [78] M. J. Haider and M. S. Mehdi, “Study of morphology and Zeta Potential analyzer for the Silver Nanoparticles”, *Int. J. Sci. Eng. Res.*, vol. 5, no. 7, pp. 381-387, 2014.
- [79] Royal Society of Chemistry, “Ultraviolet -Visible Spectroscopy (UV)”, *RSC - Adv. Chem. Sci.*, p. 68, 2009.
- [80] Jeol Ltd, “SEM Scanning Electron Microscope A To Z Basic Knowledge For Using The SEM Construction of Instrument Electron Gun Construction of Lens Condenser Lens and Objective Lens Specimen Stage Secondary Electron Detector Image Display and Recording Vacuum System”, Jeol Ltd, pp. 1-32, 2009.
- [81] R. Rojas, “Hidroxisales de ni y zn:”, no. May, p. 240, 2005.
- [82] K. Rani Das, “A Brief Review of Tests for Normality”, *Am. J. Theor. Appl. Stat.*, vol. 5, no. 1, p. 5, 2016.
- [83] S. Segnini, “Prueba de normalidad Shapiro-Wilk”, *Fundam. Bioestad.*, pp. 1-8, 2005.
- [84] Y. Zhang, T. Xj, W. Hy, Y. Dm, Z. Sl, and W. Dy, “Etymologia: Bonferroni correction”, *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 21, no. 2, p. 289, 2015.
- [85] J. H. Donis, “Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica”, *Av. Biomed. Insitituto Inmunol. Clínica*, vol. 1, no. 2, pp. 73-81, 2012.
- [86] C. Cuevas Renaud and A. Alejo Martínez, “Sensibilidad y Especificidad de una prueba”, *Univ. Nac. Auton. Mex.*, pp. 5-6, 2010.

- [87] “Calcula tu IMC”. [Online]. Available: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/calculaimc>. [Accessed: 25-Jan-2019].
- [88] “Definición de NIC 3 - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute”. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/nic-3>. [Accessed: 25-Jan-2019].
- [89] “BioMates: Pruebas diagnósticas. Parámetros fundamentales”. [Online]. Available: https://www.sgapeio.es/INFORMEST/VICongreso/taller/applets/biomates/disc/disc_param/disc_param.htm. [Accessed: 27-Jan-2019].
- [90] S. M. Nava et al., “Certeza diagnóstica de la colposcopia, citología, histología de las lesiones intraepiteliales”. *Rev Invest Med Sur Mex*, vol. 20, no. 2, pp. 95-99, 2013.
- [91] C. W. Douglass and C. H. Fox, “Determining the Value of a Periodontal Diagnostic Test”. *J. Periodontol.*, vol. 62, no. 12, pp. 721-730, 1991.