



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN
POSGRADO DE ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA
ORAL Y MAXILOFACIAL

EFICACIA DEL CISPLATINO Y NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE ZINC Y MAGNESIO EN UN MODELO 3D DE
SUBCULTIVO LINFOIDE.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL

PRESENTA:

CD. NANCY LETICIA MENDOZA MARTÍNEZ

TUTORA PRINCIPAL:

ESP. KARLA MAYELA AVELAR JUÁREZ
ADSCRITA AL POSGRADO DE ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA
ORAL Y MAXILOFACIAL, ENES LEÓN, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. RENÉ GARCÍA CONTRERAS
ADSCRITO AL POSGRADO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
BIOMATERIALES DENTALES, ENES LEÓN, UNAM.



MÉXICO, LEÓN, GUANAJUATO; 8 DE ABRIL DE 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

I. Agradecimientos	6
II. Dedicatoria	8
III. Introducción	8
IV. Marco Teórico	10
1. Neoplasias de cabeza y cuello	10
1.1 Neoplasias hematológicas en cabeza y cuello	10
1.2 Líneas celulares en patología bucal	11
2. Cultivos celulares 2D y 3D	12
2.1 Definición y clasificación de cultivos celulares	12
2.2 Cultivos 3D	12
2.2.1 Técnicas de elaboración de cultivo 3D	14
2.2.2 Comparación entre modelo 2D y 3D	15
2.2.3 Microambiente en los esferoides	16
3. Fármacos antineoplásicos	17
3.1 Clasificación	17
3.2 Cisplatino	18
3.2.1 Farmacodinamia y farmacocinética	18
3.2.2 Quimiorresistencia	19
4. Nanopartículas	21
4.1 Nanomedicina	21
4.2 Uso de las nanopartículas en Odontología	22

4.3 Clasificación de nanopartículas	22
4.4 Nanopartículas de ZnO	23
4.4.1 Fisiología celular	24
4.4.2 Uso de las nanopartículas de ZnO en terapia antineoplásica	24
4.5 Nanopartículas de MgO	24
4.5.1 Fisiología celular	25
4.5.2 Uso de las nanopartículas de MgO en terapia antineoplásica	25
V. Planteamiento del problema	26
VI. Pregunta de investigación	27
VII. Hipótesis	27
VIII. Justificación	28
IX Objetivos	29
X. Material y métodos	30
XI. Resultados	40
XII. Discusión	45
XIII. Conclusiones	48
XIV. Referencias bibliográficos	50
XV. Anexos	57

Índice de gráficos, figuras e imágenes

Gráfica 1	Estadística del cáncer, 2023	10
Imagen 1	Modelo 2D y 3D	13
Imagen 2	Zonas de un esferoide (modelo 3D)	13
Imagen 3	Microambiente tumoral	16
Imagen 4	Efecto del cisplatino en ADN	19
Imagen 5	Vías de resistencia al cisplatino	20
Imagen 6	Acción de nanopartículas en células cancerígenas	22
Imagen 7	Mecanismo de ROS	24
Imagen 8	Metodología de biopsia y explante primario	32
Imagen 9	Metodología del procesamiento del SEDH	33
Imagen10	Metodología del cultivo primario por explante	34
Imagen11	Metodología para determinar la dosis citotóxica en modelo 2D.	35
Imagen12	Metodología en preparación de modelo 3D (esferoides).	36
Imagen13	Metodología de tratamientos y recolección de esferoides.	37

Imagen 14	Metodología de procesamiento en SEDH de modelo 3D (esferoides).	39
Figura 1	Estudio histopatológico teñido con H&E de biopsia y caracterización con inmunohistoquímica. A y A* (H&E); B y B* (vimentina); C y C* (CD3).	40
Gráfica 2	Viabilidad celular en porcentaje a diferentes dosis de antineoplásicos y nanopartículas.	41
Figura 2	Esferoides cultivados observados con microscopía inversa (A) y H&E (B)	42
Figura 3	Esferoides tratados y observados con microscopía inversa de luz (A, D, G); esferoides observados con microscopía de luz y teñidos con H&E (B, E, H) e inmunomarcador con Ciclina D1 (C, F, I)	44

Índice de tablas

Tabla 1	Operalización de variables	31
Tabla 2	Viabilidad celular con dosis/respuesta en cultivo 2D	41
Tabla 3	ANOVA de esferoides tratados	43
Tabla 4	Diferencia significativa de esferoides tratados	43

I. Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres que siempre están ahí para apoyándome en las decisiones y proyectos que me propongo, sin ellos, esto sería casi imposible.

De igual manera agradecer a mis profesores por la transmisión de sus conocimientos, la atención y paciencia que siempre tuvieron para enseñarnos y al CONAHCYT por el apoyo económico a través del programa de becas de posgrado.

II. Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mi hijo, porque fue un sacrificio para ambos.

III. Introducción

A pesar de los avances en el tratamiento del cáncer durante las últimas décadas, sigue siendo un desafío debido a la complejidad y heterogeneidad de los tumores, lo cual, genera líneas de investigación para la búsqueda de nuevo tratamientos para el cáncer, sin embargo, la mayoría de los datos publicados derivan de experimentos realizados en condiciones bidimensionales (2D). Estos cultivos de monocapa de células convencionales, son creados en condiciones simplificadas y poco realista, no reflejan completamente la fisiología del tumor.¹

Cuando se quiere confirmar un fenómeno o mecanismo observado in vitro, el enfoque habitual es el uso de modelos animales. Sin embargo, existen muchas preocupaciones con respecto a estos métodos. Por lo tanto, el cambio de cultivos 2D a cultivos tridimensionales (3D) está motivado por la necesidad de crear modelos celulares que capturen mejor las complejidades de la biología tumoral, la interacción célula-célula y su microambiente.²⁻³

Trabajar en modelos 3D implica la formación de esferoides. Los esferoides son agregados que pueden crecer utilizando diferentes métodos, entre ellos el de suspensión, encapsulación o crecimiento sobre una matriz 3D. Esto nos permite tener un acercamiento al comportamiento celular dentro del tumor y poder observar qué tratamientos son más efectivos.⁴

Uno de los tratamientos de mayor demanda y uso, es la quimioterapia, entendiéndose como la aplicación de diferentes tipos de medicamentos que dañan y disfuncionan las vías metabólicas de las células malignas.⁵

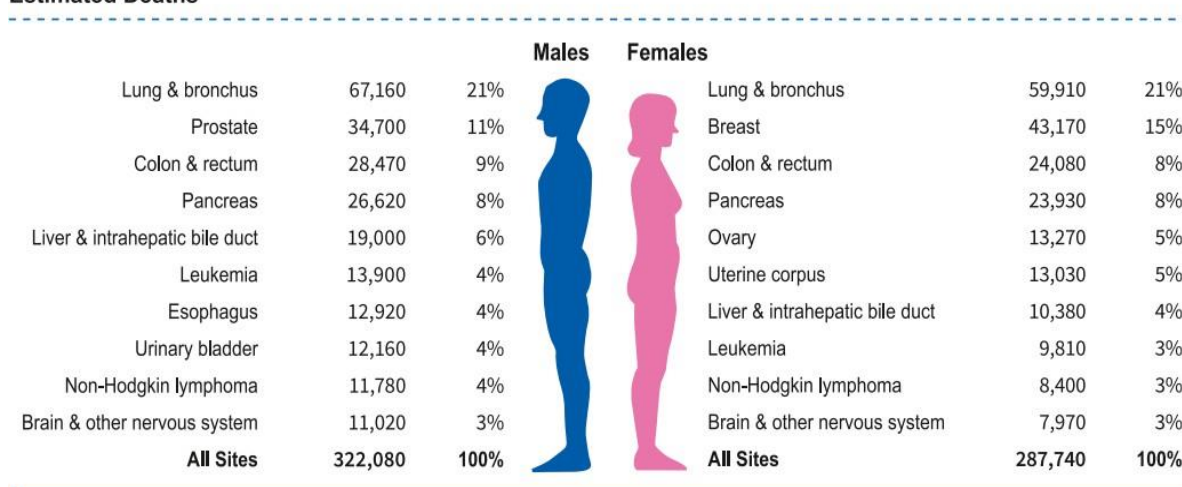
El Cisplatino es un antineoplásico de uso frecuente para la quimioterapia oral contra el cáncer, sin embargo, la quimiorresistencia a este fármaco va en aumento en la mayoría de los cánceres. Es por ello que una estrategia innovadora, es el uso de nanotecnología médica que utiliza materiales que generalmente son de 1 a 200 nm. Estos materiales se aplican en el diseño y fabricación de fármacos para su uso terapéutico.^{6,7}

Dentro de la clasificación general de nanopartículas (NP's) están las orgánicas e inorgánicas, estas últimas, caracterizadas por su citotoxicidad y generación de ROS. Las más utilizadas en el campo médico, son el Óxido de Zinc (ZnO) y de Magnesio (MgO), teniendo un campo prometedor dentro de la nanomedicina gracias a su excelente difusión con los tejidos tumorales. Por lo tanto, este estudio se realizó basado en un modelo 3D de un subcultivo linfoide tratado con antineoplásicos, nanopartículas y conjugados, para determinar cuál es de mejor eficacia contra las células tumorales.^{8,9}

IV. Marco Teórico

El cáncer es un importante problema de salud pública en todo el mundo, hablando específicamente de las neoplasias hematológicas, estas son las terceras en clasificarse dentro del cáncer en general¹⁰, encontrándose por detrás de las neoplasias de pulmón y mama. En México, es la 9° causa de muerte y a pesar de ser varias las neoplasias identificadas¹¹, los linfomas, las leucemias y los mielomas son los más frecuentes, representando el 10 % de todos los diagnósticos de cáncer hematológico.¹²

Estimated Deaths



Gráfica 1. Estadísticas del cáncer, 2023.

Fuente: Siegel RL, et al.¹³

El tratamiento actual de las neoplasias malignas hematológicas incluye la combinación de quimioterapia, radioterapia y/o trasplantes de médula ósea.¹⁴ Los avances en el tratamiento han mejorado notablemente en las últimas décadas, sin embargo, a pesar de las importantes inversiones en la investigación del cáncer, en el descubrimiento y el desarrollo de fármacos, menos del 5 % de todos los nuevos fármacos se descubren en ensayos de inhibición del crecimiento realizados en paneles de líneas de células tumorales en cultivo bidimensional (2D).¹⁵

Los primeros científicos que realizaron cultivos empleando una técnica in vitro, a finales del siglo XIX, encontraron numerosas dificultades y limitaciones. Fue en los años 50 cuando se establece la primera línea celular (células HeLa), su crecimiento era con un medio de cultivo formado por plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical.¹⁶

Desde entonces, se han empleado varias líneas celulares, incluyendo las líneas celulares derivadas de tumores de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), que han sido una herramienta invaluable para los investigadores desde la década de 1950.¹⁷

Se denomina cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células in vitro conservando sus características celulares¹⁶ y se pueden clasificar en:

Cultivo de órganos: el tejido, órgano o fragmento de tamaño considerable, se coloca sobre una rejilla, éste debe estar situado en la interfase líquido-gas, mantenerse en un medio de cultivo con los nutrientes necesarios y a la vez, liberar los desechos que se genere, esta disposición del tejido mantiene su tridimensionalidad. Una de sus limitaciones es que solo proliferan las células embrionarias situadas en la periferia.^{16,18}

Explantos primarios: Es una técnica donde se adhieren fragmentos de tejidos a una superficie, quedando en la interfase sólido-líquido, promoviendo el crecimiento celular en la periferia, donde pueden proliferar o migrar.¹⁶ La muestra fresca puede tratarse con una solución antibiótica triple que consta de penicilina, estreptomicina y anfotericina B. Los fragmentos de tumor triturados se cultivan en un medio mínimo suplementado con aminoácidos, suero y las células epiteliales para que sigan creciendo.¹⁷

Cultivo celular: Este se obtiene a partir de explantes primarios o suspendiendo en un medio de cultivo, células disgregadas obtenidas a través de métodos enzimáticos o mecánicos. El cultivo celular de este tipo es el más utilizado y se puede utilizar como monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo.^{16,18}

El método más popular para establecer una nueva línea celular es por explantes.⁸ El establecimiento de una nueva línea de células cancerosas depende de varios factores, siendo el más importante el método de obtención de la muestra. La extirpación quirúrgica de tejido tumoral fresco en condiciones asépticas específicamente para uso de laboratorio, de áreas no necróticas y no infectadas, aumenta en gran medida la tasa de éxito de un cultivo a largo plazo.¹⁶⁻¹⁸

Actualmente, todas estas dificultades que antes se han nombrado se han superado en su mayoría. En las últimas cuatro décadas, miles de laboratorios de todo el mundo han llevado a cabo cultivos in vivo de 2D.¹⁶ Sin embargo, muchos de los medicamentos fallan durante los ensayos clínicos, especialmente durante la fase III, que es la fase de eficiencia clínica y/o toxicidad inaceptable.¹

Los modelos 2D proliferan más rápido que las células de tumores primarios, muestran patrones alterados de resistencia a los medicamentos y responden preferentemente a los agentes antiproliferativos, mientras pasan por alto las células madre tumorales que se renuevan a sí mismas y a la población, lo que contribuye a la recurrencia y la metástasis. Los ensayos 2D no recapitulan la compleja arquitectura tridimensional, las interacciones célula-célula, los microambientes, la cinética de difusión de fármacos y las respuestas a los fármacos de los tumores sólidos.¹⁹

Recientemente, el interés ha aumentado en busca de nuevos modelos que representen con mayor precisión el microambiente real donde residen las células en los tejidos. Por lo tanto, el comportamiento de las células cultivadas en 3D reflejan más los entornos de respuesta celular. La dimensionalidad adicional de los cultivos 3D es la característica crucial que conduce a las diferencias en las respuestas celulares, porque no solo influyen en la organización espacial de los receptores de superficie celular que interactúan con las células circundantes, sino que también, inducen limitaciones físicas a las células, muestran una cinética de crecimiento, aumento de contacto célula-célula y célula- matriz, alterando los patrones de expresión génica y la resistencia al tratamiento antineoplásico, también limita, dentro y fuera de los esferoides, la difusión de nutrientes, oxígeno y tratamiento antineoplásico.^{2-4,20,21}

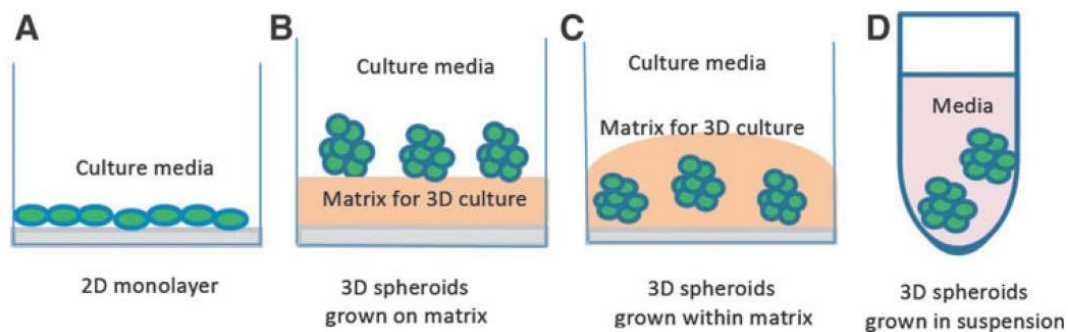


Imagen 1.- Modelo 2D y 3D

Fuente: Edmondson R, et al.¹

Los esferoides están compuestos por una capa externa de células en proliferación, una capa interna de células quiescentes y un núcleo interno de células necróticas. Esta disposición refleja el patrón de crecimiento de los tumores sólidos in vivo, con células proliferantes que se encuentran más cerca de un suministro de nutrientes y oxígeno. La hipoxia constante en el núcleo conduce a la glucólisis y la síntesis de CO_2 , piruvato y lactato, dando como resultado una acidificación del medio. Las células tienen que adaptarse a este ambiente hostil para crecer, por lo tanto, algunos agentes como el 5-fluoracilo y el cisplatino, que funcionan con oxígeno, son menos efectivos en el modelo 3D.¹⁵

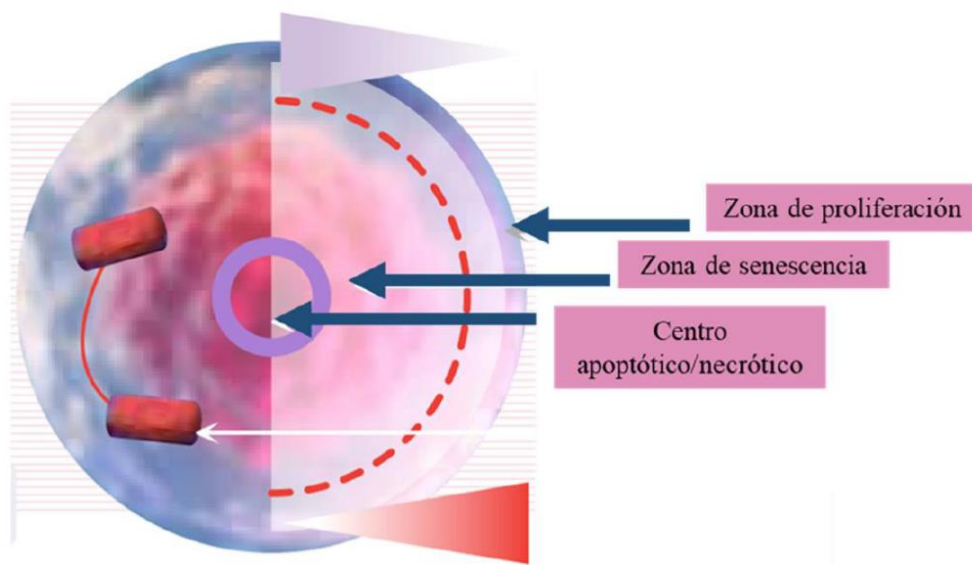


Imagen 2.- Zonas de un esferoide (modelo 3D).

Fuentes: Alcántara Q.²²

Los factores que afectan la formación de los esferoides incluyen el tipo de célula, la densidad celular de la siembra, el tipo de medio de cultivo y el tiempo de incubación.¹⁷

Los esferoides varían de diámetro, sin embargo, es menor a 500 μm , logrando cultivar gran número de células en un volumen relativamente pequeño. Cuando los esferoides están listos para los experimentos, es muy importante seleccionar esferoides del mismo tamaño, ya que una ligera diferencia de diámetro puede resultar en una diferencia de volumen dramática.^{16,17,22}

Según el tipo de célula utilizada, los cultivos tridimensionales se pueden clasificar en Primarios, es decir, cuando el fragmento que se cultivó no sufrió modificaciones y es directamente de una célula pluricelular. El otro es el secundario y se denomina así cuando parte de células que ya han sido cultivadas previamente, estas se reorganizan sobre una malla tridimensional que sirve de estroma.^{16,18}

Dentro de la generación de esferoides, existen varios métodos: I) métodos de gota colgante, II) Métodos de superficie no adherente, III) Cultivo en suspensión, IV) En andamios, V) Levitación magnética y bioimpresión, VI) métodos microfluídicos. De los cuales, los más utilizados son los siguientes.^{16,22}

Método de gota colgante: fue originalmente un método de microbiología utilizado para estudiar bacterias en un entorno confinado y controlado. Se colocan gotas de suspensiones celulares en la parte inferior de la tapa de una placa Petri. En general, el método de la gota colgante es bastante simple y consistente. Se conserva la interacción directa natural célula-célula y célula-ECM (matriz extracelular) que tienen lugar in vivo. Los esferoides se pueden mantener en cultivo durante varias semanas dentro de la matriz de gotas, lo que permite el desarrollo de experimentos complejos.²³

Formación espontánea de esferoides: Se utilizan placas de fijación ultra baja recubriendo con un sustrato inerte (agar o metacrilato de poli-2-hidroxietilo) que evita que las células se adhieran a la superficie de los pocillos, lo que obliga a las células a segregarse y formar esferoides.¹⁵

Modelos basados en andamios: Las células pueden colocarse en placas en la parte superior de la matriz después de la solidificación o mezclarse con hidrogel líquido (matriz) y luego colocarse en placas para que las células puedan incrustarse dentro de la matriz durante la gelificación. En el primer método, las células simplemente se agregan encima del hidrogel después de la solidificación de este, se cultivan a 37°; el segundo método, las células se mezclan y se incuban a 37° (las células se incrustan mientras solidifican). Matrigel y colágeno son buenos ejemplos de andamios naturales que pueden ofrecer una correcta unión celular y una buena reorganización 3D. El colágeno ofrece las ventajas de la compatibilidad celular, la posibilidad de adhesión celular sin modificación y un entorno viscoelástico nativo para las células. El uso de hidrogel sintético permite el control de las propiedades bioquímicas y mecánicas y, por lo tanto, mejora el mimetismo de la matriz extracelular tumoral. Debido a sus propiedades inertes permite el crecimiento 3D.^{15,22-24}

Si comparamos los modelos 2D y 3D, se pueden enumerar 4 importantes diferencias: Primero, las diferencias en propiedades físicas y fisiológicas entre cultivos 3D y 2D. Mientras que las células cultivadas en 2D se estiran en un estado no natural sobre un sustrato plano, las células 3D en un andamiaje biológico o sintético mantienen su morfología celular.^{1, 25-27}

En segundo lugar, la diferencia en la expresión y la organización espacial de los receptores de superficie en los cultivos 3D y 2D. Muchos de los medicamentos están diseñados para designarse a receptores específicos en las superficies celulares. El nivel de expresión de los receptores y la eficiencia de unión de un fármaco a estos receptores pueden ser diferentes en cultivos 2D y 3D.^{1, 25,26}

En tercer lugar, la diferencia en los niveles de expresión del gen del cáncer. Las células que crecen en monocapa están bajo estrés y, por lo tanto, algunos genes y proteínas que se expresan se alteran como resultado de este estado antinatural. Estos genes y proteínas pueden participar en las acciones de los fármacos y, por lo tanto, afectar la eficacia de un fármaco para las células.^{1, 25,26,28}

En cuarto lugar, la diferencia entre las etapas celulares. Mientras que las células en cultivo 2D son en su mayoría células en proliferación, las células en cultivos 3D suelen ser una mezcla de células en diferentes etapas.^{1, 25}

Otro punto importante a considerar, dentro de los modelos 3D, es la comprensión del microambiente tumoral (MET-TME) puede ampliar el conocimiento para diseñar enfoques terapéuticos más específicos con una mayor capacidad de focalización de las células cancerosas. Este, consta de diferentes tipos de células no cancerosas y su estroma que tienen un papel específico en su fisiología, estructura y función del tumor.^{15,24,26}

Al simular el microentorno multicelular se investiga la fisiología de las células tumorales, la respuesta a los agentes terapéuticos, así como el estudio de la proliferación celular, apoptosis, la diferenciación de células, la expresión génica, el metabolismo de las células tumorales en un contexto multicelular, la cinética de crecimiento y la tasa metabólica.²⁹

Las condiciones hipóxicas, hipoglucémicas y ácidas características de la TME representan desencadenantes importantes para la liberación de fármacos, la forma de administración del fármaco, la resistencia y respuesta a la radioterapia y quimioterapia, que son similares a las células in vivo.^{1,29}

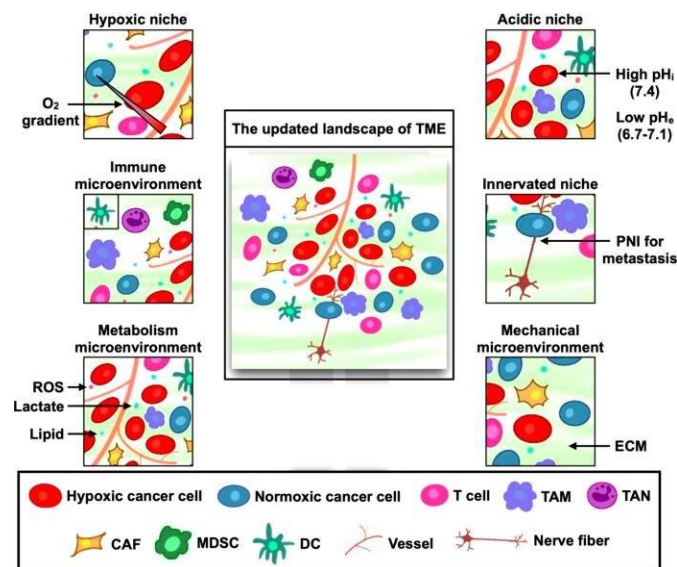


Imagen 3.- Microambiente tumoral.

Fuente: Niculescu.²⁹

Pese a los éxitos terapéuticos de la quimioterapia, pocas categorías de fármacos tienen un margen tan estrecho de antineoplásico y una posibilidad tan grande de causar efectos nocivos al huésped, debido a que, la mayor parte de los fármacos antineoplásicos interactúan con el ADN o sus precursores, inhibiendo la síntesis de nuevo material genético y ocasionando daños en células malignas y normales. Dentro de la clasificación general de estos medicamentos incluyen: Fármacos alquilantes, antimetabolitos análogos del ácido fólico, de la pirimidina y de la purina, hormonas, antagonistas de hormonas y específicos moleculares. De los cuales, los alquilantes son los más utilizados.³⁰

Existen 6 principales fármacos alquilantes en la quimioterapia: Del grupo de las mostazas nitrogenadas, etileniminas, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triazenos y que metilan el ADN y los derivados del platino.^{31,32} La Administración Federal de Medicamentos (FDA) ha aprobado solo siete medicamentos para el cáncer, y son: metotrexato y 5-fluoracilo en la década de 1950, biomicina y cisplatino en la década de 1970, docetaxel y cetuximab en 2006 y pembrolizumab en 2016.^{6,19}

El compuesto $\text{cis-[Pt (NH}_3\text{)}_2\text{Cl}_2\text{]}$ fue preparado y descubierto por primera vez por Michele Payroné en 1845 y por eso se le llamo sal de Payroné durante mucho tiempo. La estructura de la sal de Payroné fue correctamente deducida por Alfred Werner en 1893. Pero la misteriosa propiedad de inhibición de la división celular fue descubierta accidentalmente en 1965 por Barnett Rosenberg, un biofísico en el estudio de los efectos del campo eléctrico en el crecimiento bacteriano, donde utilizó platino como electrodo y cloruro de amonio como tampón. Durante sus experimentos, descubrió que la bacteria *E. coli* seguía creciendo hasta 300 veces su tamaño normal en lugar de división celular al aplicar un campo eléctrico y cuando se cortaba el campo eléctrico, la célula bacteriana comenzaba a dividirse nuevamente. En 1969, Rosenberg ha demostrado que el cisplatino tiene la capacidad de inhibir el sarcoma de 180 ratones y la leucemia de 1210 ratones. Las pruebas posteriores sobre el fármaco han encontrado que es activo contra una amplia variedad de sistemas tumorales.^{5,33}

El cisplatino fue aprobado por primera vez por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU en 1978 para su uso en cánceres testiculares y de ovario. Durante décadas, el cisplatino y otros análogos a base de platino se han convertido en armas importantes que luchan contra una amplia variedad de cánceres, incluidos el cáncer de cabeza y cuello.^{34,35}

El modo de acción citotóxico del cisplatino está mediado por su interacción con el ADN, principalmente. Después de unirse al ADN, el cisplatino inhibe la replicación y provoca la detención en la fase G2 del ciclo celular, lo que da como resultado la apoptosis. Estas interacciones dan como resultado un consumo isotónico reducido y/o mantenimiento directo de la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS). Estas tienen un papel doble en la citotoxicidad del cisplatino, desencadenando directamente la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) o agravando el daño del ADN inducido por el cisplatino.^{5,35,36}

Las lesiones inducidas por cisplatino causan distorsiones en el ADN que pueden identificarse mediante múltiples vías de reparación. Entre estos, los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y reparación de errores de emparejamiento (MMR) son los mecanismos más destacados para la eliminación de cisplatino. Si el daño no se puede reparar, las células se comprometen a la muerte (generalmente apoptótica). Esto implica la activación secuencial de ATR (proteína mutada de ataxia telangiectasia y relacionada con RAD3, un sensor de daño en el ADN) y el punto de control quinasa 1 (el sustrato más destacado y el efecto agua debajo de ATR) que a su vez fosforila la proteína supresora de tumores TP53, está activa varios genes cuyos productos promueven MOMP, lo que desencadena la apoptosis endógena, así como genes que codifican componentes de vías apoptóticas exógenas. La vía extrínseca se activa cuando el ligando se une a los miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral- α y luego forma el complejo de señalización que induce la muerte a través de la oligomerización de la molécula conectora y el reclutamiento de procaspasa-8. Las vías intrínsecas se inician por tensiones celulares como el daño del ADN, lo que lleva a la liberación de citocromo C por parte de las mitocondrias, que activa la procaspasa-9. Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la apoptosis inducida por daño en el ADN al regular la liberación del citocromo C mitocondrial en respuesta al daño en el ADN.^{35,37}

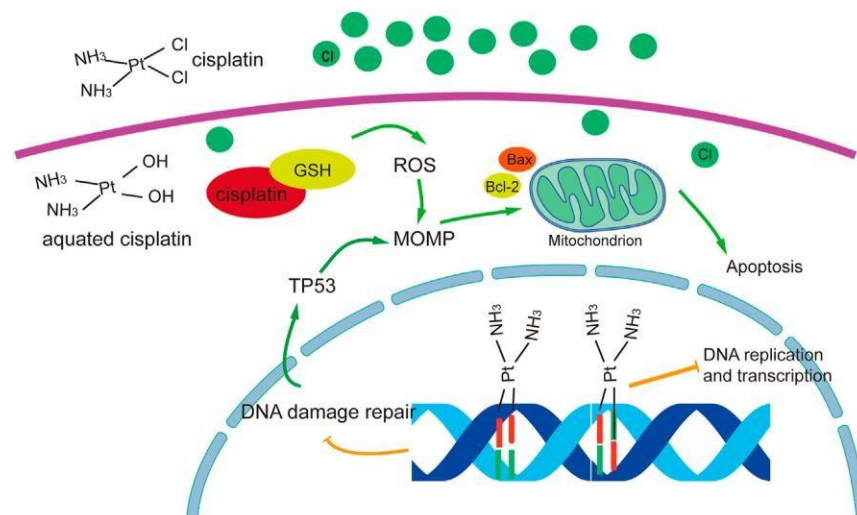


Imagen 4.- Efecto del cisplatino en ADN.

Fuente: Wang et al.³⁵

El cisplatino ofrece un éxito inicia con respuestas parciales y estabilización de la enfermedad en muchos pacientes, pero desafortunadamente, su utilidad clínica se ve limitada en última instancia por el hecho de que la mayoría de los pacientes eventualmente desarrollaran resistencia la cisplatino, lo que provocará la recurrencia del tumor. Tras la absorción y el procesamiento celular, el cisplatino se une al ADN. Luego, esta forma de lesión del ADN es detectada por el mecanismo de vigilancia celular, generalmente denominado “respuesta al daño de ADN” (DDR), que finalmente determina el destino celular a través de la activación coordinada de varias vías posteriores. Por lo tanto, se ha anticipado ampliamente que la futura eliminación de la vida es DDR es la clave para una mejor comprensión de la quimiorresistencia y el desarrollo de tratamientos contra el cáncer más eficaces.^{34.}

La quimiorresistencia a los fármacos es un obstáculo importante. Existen dos formas de resistencia: resistencia intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia intrínseca es la resistencia que se produce desde el inicio del tratamiento con el fármaco, mientras que para la resistencia adquirida el fármaco es inicialmente activo, pero se vuelve inactivo con el tiempo. La resistencia al cisplatino puede ser posible al disminuir la captación celular del fármaco, disminuir la entrada o aumentar la salida del fármaco, la desintoxicación del fármaco por los tioles celulares, la interacción del objetivo del fármaco y la reparación del ADN.^{35,38,39}

La quimiorresistencia durante la circulación del fármaco a través del torrente sanguíneo al administrarse vía intravenosa y, por lo tanto, circula por la sangre antes de ingresar a las células cancerosas. Las proteínas presentes en el torrente sanguíneo se pueden unir con el cisplatino. Esta unión a proteínas es responsable de la desactivación del cisplatino. El 65-95% del cisplatino se une a la proteína plasmática justo después de un día de administración.^{5,35}

De igual manera, la resistencia durante la entrada o salida del fármaco a través de la membrana celular: La disminución del flujo de entrada y el aumento del flujo de salida del cisplatino provocan una menor acumulación de fármaco en las células cancerosas.^{5,40}

Por último, la resistencia después de la unión cisplatino-ADN. NER es la mejor manera de eliminar las lesiones del ADN para inducir la resistencia al cisplatino. El sistema NER elimina los nucleótidos dañados en ambas cadenas y luego sintetiza el ADN para reconstruir la integridad del gen. Las células con sobreexpresión con NER denotan una sensibilidad muy baja al cisplatino. La proteína MMR es una proteína muy importante que generalmente intenta reparar el daño del ADN-cisplatino. Si no se repara, entonces conduce a la apoptosis. La resistencia al cisplatino también es posible debido a la desregulación inducida por fármacos de la función del microARN. Esta desregulación puede causar problemas en la señalización celular, la metilación del ADN y la supervivencia celular que dan como resultado la resistencia al cisplatino.^{5,34}

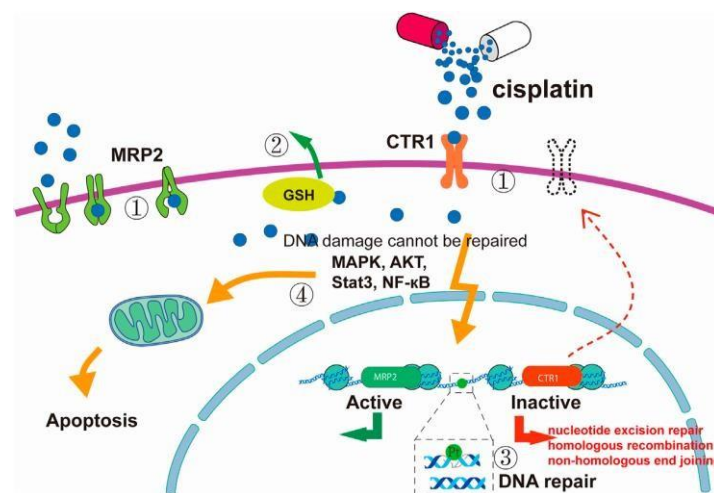


Imagen 5.- Vías de resistencia al cisplatino.

Fuente: Wang et al.³⁵

La nanotecnología permite la producción de materiales nanométricos con propiedades físicas y químicas únicas que los convierten en candidatos adecuados para las aplicaciones médicas. En general incluye la síntesis y el control de materiales con dimensiones menores a 200 nm. La nano-oncología es la rama de la nanotecnología, que se relaciona con la aplicación de nanomateriales para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Brinda la oportunidad de explorar el potencial terapéutico que antes era inalcanzable debido a las restricciones químicas, físicas o biológicas.^{8,37,41,42}

Dentro del campo de la odontología, se han desarrollado nuevos materiales con el fin de mejorar aquellos que ya se encontraban disponibles. Algunos nano-materiales sintetizados a base de polímeros, moléculas metálicas e inorgánicas, proveen una mejora en calidad de los cuidados en la higiene, propiedades mecánicas, antibacterianas, fluorescencia, antitumorales, remineralización y regenerativas.^{43,44}

El interés particular de la investigación de las nanopartículas aplicadas a la oncología, va dirigida a nanotransportadores que puedan mejorar la biodisponibilidad de los fármacos, acumularse de manera eficiente y específica en el sitio del tumor, interactuar con las unidades funcionales de la célula debido a su pequeño tamaño, biocompatibilidad, potencializar la liberación sostenida o citotoxicidad en tumores y liberar agentes bioactivos encapsulados o conjugados en respuesta a las condiciones químicas y biológicas únicas del microambiente tumoral.^{7,29,34,36,45,46}

Una gran cantidad de nanopartículas con una dimensión de 50-200 nm se utilizan generalmente como nanotransportadores de medicamentos contra el cáncer. Estas nanopartículas generalmente son absorbidas por las células cancerosas con la ayuda del efecto de permeabilidad y retención mejorada. Uno de los puntos más importantes sobre la nanoentrega es la alta reactividad superficial e interacciones mejoradas con las estructuras celulares, en particular con la membrana plasmática que es la principal barrera que separa la célula del medio que la rodea. Las membranas de las células de los mamíferos están formadas principalmente por cargas negativas, lo que le da adsorción de las NP's cargadas positivamente. Esta absorción no solo puede causar daño a la membrana, sino también impulsar la penetración de las NP's dentro de las células por difusión pasiva o podría ser internalizada por la célula a través de la endocitosis.^{8,46}

Otro punto importante es la capacidad de las células cancerosas para evadir la vigilancia inmunológica y dirigirse a células homólogas debido a proteínas y receptores específicos en sus superficies. Las membranas de células cancerosas tienen las moléculas de adhesión celular de la superficie de las células de origen, incluidas selectinas, cadherinas, superfamilias de inmunoglobulinas, integrinas y receptores linfocíticos.⁴⁷ debido a esta evasión inmunitaria, los tratamientos han beneficiado a una minoría de pacientes. Por ello, se busca mejorar la inmunidad antitumoral a través de nanopartículas capaces de facilitar la acción de células inmunitarias antitumorales, logrando el aumento de la captación de las células cancerosas.⁴³

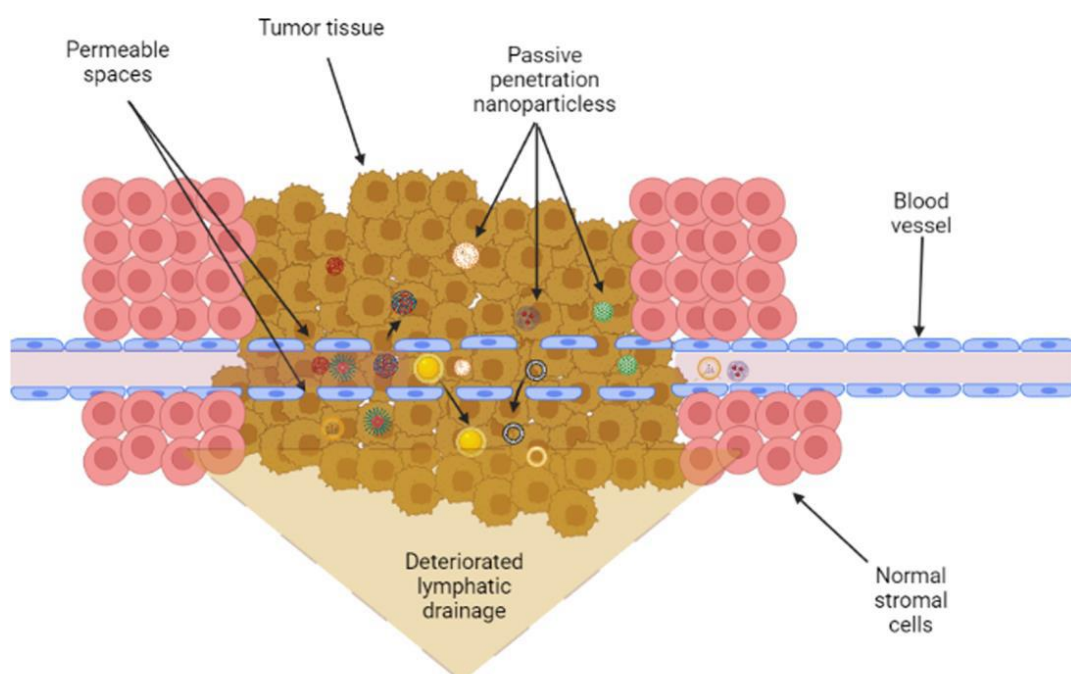


Imagen 6.- Acción de nanopartículas en células cancerígenas.

Fuente: Zoubi MAS.⁴⁸

Dentro de la clasificación de nanomateriales se encuentra la que está basada en su composición química, se puede considerar una división primaria en orgánicos e inorgánicos y subclasificarse es: 1) Orgánicas, 2) inorgánicas, 3) virales 4) híbridas.^{48,49}

Basándonos en la primera división, las nanoestructuras de base orgánica son materiales más amigables con el medio ambiente (por ejemplo, ferritina, liposomas, micelas y dendrímeros).^{48,50-51}

En comparación con las nanopartículas orgánicas, las nanopartículas inorgánicas (INP) poseen características ópticas, eléctricas y magnéticas únicas, lo que hace tener una perspectiva de aplicación prometedora en el diagnóstico y tratamiento de tumores. Sin embargo, la aplicación clínica de las NPI sigue siendo un desafío debido a su limitada biocompatibilidad y capacidad de direccionamiento.^{8,47,48} Algunos ejemplos son: nanopartículas oro, plata, cobre, hierro, óxido de Zinc y magnesio, entre otras, que muestran profundas aplicaciones en el campo biomédico.^{5,50,52} Cada una de ellas tiene sus características únicas que las convierte en una herramienta novedosa y eficiente. De entre ellas, las partículas de ZnO muestran una aplicación y eficacia prometedora.⁸

El Zinc (Zn) es un mineral esencial para nuestro cuerpo y está presente en el cerebro, músculos, huesos, etc. No es tóxico en condiciones fisiológicas.⁵² La administración de Drogas y Alimento de EE. UU (FDA) reconoce al ZnO como una sustancia que se permite su uso en productos sanitarios y de farmacia. Son de tamaño nanométrico inferior a 100 nm y en condiciones fisiológicas, su valor de pH es aproximadamente 7.4 por lo que están cargadas positivamente. Esto proporciona condiciones favorables para su interacción con las células tumorales, que frecuentemente llevan carga superficial de la membrana negativa. La disolución del Zinc ocurre más fácilmente en el régimen ácido, por lo que, probablemente las NP's de ZnO se disuelven más fácilmente en el microambiente ácido del tumor derivado del efecto Warburg, es decir, las células cancerosas favorecen la glucólisis incluso en condiciones aeróbicas sobre el metabolismo mediante la vía de fosforilación oxidativa.^{8,45,46}

Se demostró que las NP's de ZnO pueden afectar la respiración celular de las células cancerosas. Cuando se agota la capacidad celular para mantener la homeostasis del Zinc, parece iniciarse un círculo vicioso de daño celular que finalmente conduce a la muerte celular.^{8,45}

Otro mecanismo de apoptosis es a través del estrés oxidativo, este es el resultado del desequilibrio entre oxidantes, antioxidantes y especies reactivas de oxígeno (ROS) en los entornos celulares. Estos metabolitos intracelulares producidos por las mitocondrias juegan un papel importante en la señalización celular y la homeostasis. En general, los niveles de ROS promueven la proliferación y el crecimiento tumoral, sin embargo,

mientras los niveles ROS se mantengan altos, inician el estrés oxidativo e inducen la muerte celular. Como los niveles de ROS son dañinos, las células tumorales activarán los antioxidantes, sistemas de defensa para evitar la acumulación de ROS a niveles letales. Un enfoque prometedor para inducir la muerte de las células tumorales es elevar los niveles intracelulares de ROS y bloquear el sistema de antioxidantes simultáneamente.^{41, 9, 52-54}

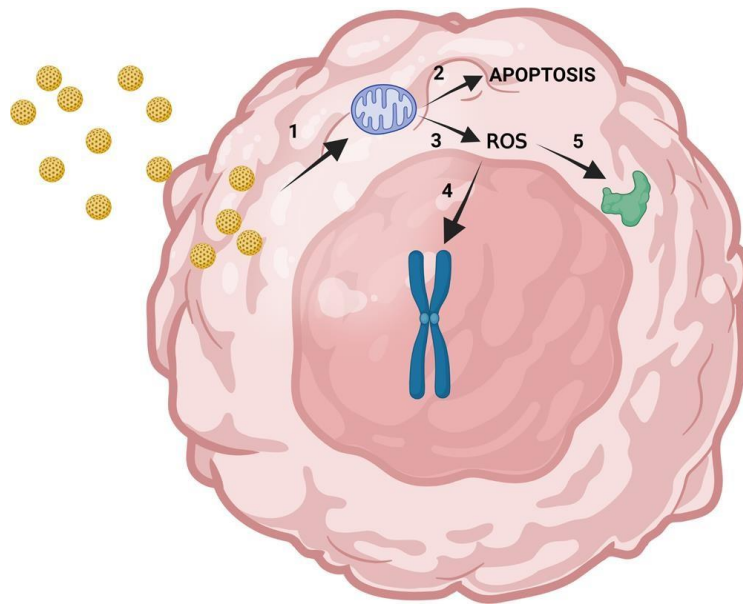


Imagen 7.- Mecanismo de ROS.

Fuente: Zoubi MAS.⁴⁸

Además de la posibilidad de utilizar NP's ZnO como agente terapéutico independiente, existe la posibilidad de combinarlos con terapias estándar establecidas, como la quimioterapia y radioterapia. Se ha previsto que los medicamentos contra el cáncer se pueden cargar en ZnO para combinar ambas terapias y lograr efectos aditivos o sinérgicos de ambos tratamientos. Los resultados son prometedores con doxorubicina, daunorrubicina, paclitaxel o cisplatino.^{9,45,,52,55}

Por otro lado, las NP's de MgO también son un campo prometedor dentro de las terapias antineoplásicas. El Magnesio (Mg) es un micronutriente esencial requerido para muchas funciones. En su forma mineral es necesario para el desarrollo del cerebro, regeneración ósea; en su forma de óxido se usa como antiácido, laxante a corto plazo, fertilizantes, antimicrobiano y anticancerígeno.^{49,56,57}

Este efecto anticancerígeno se debe a que los materiales que contienen metales se unen al ADN, induciendo el daño en el mismo mediado por metales, propiedad que puede beneficiarse en el desarrollo de terapias anticancerígenas basadas en metales.^{45, 58}

Las NP's de MgO, al igual que las NP's de ZnO, aumentan la generación de ROS y se disocian con más facilidad en pH ácido, permitiendo la mejor liberación del mismo y de fármacos antineoplásicos como el cisplatino en los tejidos cancerosos.^{41,54,56,58}

Si bien, las NP's de MgO están más estudiadas en el efecto antimicrobiano que presentan, las vías de investigación dentro de la nano-oncología están en desarrollo para su utilidad como terapia oncogénica y como conjugados con antineoplásicos.⁵⁸

V. Planteamiento del problema

A pesar de los avances en el tratamiento del cáncer en las últimas décadas, sigue siendo un desafío debido a la complejidad y heterogeneidad de los tumores, lo que genera resistencia a la quimioterapia. Esta complejidad se debe en parte a la interacción del tumor y de su microambiente.¹⁵

La mayoría de los datos publicados derivan de experimentos realizados en condiciones bidimensionales (2D). Estos cultivos de monocapa de células convencionales, cultivados en condiciones simplificadas y poco realista, no reflejan completamente la fisiología del tumor.^{4,15}

Cuando se quiere confirmar un fenómeno o mecanismo observado in vitro, el enfoque habitual es el uso de modelos animales. Sin embargo, existen muchas preocupaciones con respecto a estos métodos. Por lo tanto, el cambio de cultivos 2D a cultivos tridimensionales está motivado por la necesidad de crear modelos celulares que capturen mejor las complejidades de la biología tumoral.^{15,23}

Trabajar en 3D implica la formación de esferoides. Los esferoides son agregados que pueden crecer en suspensión, encapsularse y crecer sobre una matriz 3D utilizando diferentes métodos.^{4,23}

El régimen estándar de tratamiento con quimioterapia está basado en platino. Casi alrededor del 50% de todos los pacientes son tratados con cisplatino. Se utiliza para una amplia gama de neoplasias, sin embargo, la quimioresistencia a este ha ido en aumento, generando la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento.⁵

El creciente interés por la nanotecnología, que se ocupa de la fabricación de materiales con dimensiones nanométricas y sus usos en diferentes campos a nuestro alrededor, específicamente las nanopartículas (NP) están atrayendo mucho el interés de los investigadores biológicos debido a sus amplias aplicaciones terapéuticas y sistemas de administración de fármacos en biomedicina. Algunos ejemplos son: nanopartículas de óxido de Zinc, Óxido de Magnesio, etc., que muestran profundas aplicaciones en el campo biomédico.⁵²

VI. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto citotóxico del uso de Cisplatino, ZnONPs, MgONPs y conjugados, en un modelo 3D de subcultivo linfoide, realizado en el Laboratorio de Investigación del área de Nanoestructuras de la ENES-unidad León, UNAM, ¿durante los meses de mayo-diciembre de 2022?

VII. Hipótesis

- ❖ **Hipótesis investigación:** Conjugados de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) y óxido de magnesio (MgONPs) con cisplatino disminuirá la viabilidad celular de un modelo 3D de células neoplásicas linfoides.
- ❖ **Hipótesis nula:** Conjugados de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de magnesio con cisplatino en un modelo 3D de células neoplásicas linfoides no disminuirá la viabilidad celular.

VIII. Justificación

A pesar de las importantes inversiones en la investigación del cáncer, el descubrimiento y el desarrollo de fármacos equivale a menos del 5 % de todos los nuevos fármacos que se descubren en ensayos de inhibición del crecimiento realizados en paneles de líneas de células tumorales mantenidas y analizadas en condiciones de cultivo bidimensional (2D).^{4,15,23}

Recientemente, ha incrementado el interés por nuevos modelos que representen con mayor precisión el microambiente real donde residen las células neoplásicas. Siendo de este tipo, las células cultivadas en 3D, que reflejan con mayor precisión el entorno de la respuesta celular. La dimensionalidad adicional de los cultivos 3D, es la característica crucial, porque no solo influyen en la organización espacial de los receptores de superficie celular que interactúan con las células circundantes, sino que también, inducen limitaciones físicas a las células.¹ también muestran una cinética de crecimiento, aumento de los contactos célula-célula y célula-matriz, los cuales alteran los patrones de expresión génica y la resistencia al tratamiento antineoplásico y limitan la difusión de nutrientes, oxígeno y productos fuera y dentro de los esferoides.^{2,3,4}

La resistencia de los antineoplásicos ante diversos tipos de neoplasias malignas es cada vez más común, por lo que investigar nuevas terapias con agentes bioactivos encapsulados o conjugados en respuesta a las condiciones químicas y biológicas únicas del microambiente tumoral abre nuevas posibilidades. El interés de investigar la nanotecnología como nanoacarreador con antineoplásicos es con la finalidad de mejorar las terapias, tener mejor biocompatibilidad y menor citotoxicidad a células sanas. Es por ello que el uso de antineoplásicos y nuevas terapias dirigidas en oncología son importantes.^{9,29,34,36,37,45,}

IX. Objetivos

General:

Analizar la eficacia del Cis, ZnONPs, MgONPs y conjugados como terapia antineoplásica en modelo 3D (esferoides) de un subcultivo linfoide.

Específicos:

- Determinar la dosis/respuesta citotóxica en un modelo 2D de subcultivo linfoide tratado con Cis, ZnONPs, MgONPs y conjugados, a través de ensayo de MTT.
- Crear esferoides a través de la técnica de andamios con agarosa del subcultivo linfoide.
- Analizar la eficacia del Cis, ZnONPs, MgONPs y conjugados en esferoides de subcultivo linfoide a través de ensayo de MTT.
- Analizar la reacción de inmunohistoquímica de los esferoides tratados con Cis, ZnONPs, MgONPs y conjugados.

X. Material y métodos

Diseño de estudio: Experimental, prospectivo y comparativo.

Universo: Explante de neoplasia linfoide.

Población: subcultivo celular linfoide.

Muestra: 6 esferoides de subcultivo linfoide viables para el análisis.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión:

- Que sea de forma esférica.
- Diámetro mínimo de 150 a 250 μm .

Criterios de exclusión:

- Esferoides que se perdieron por el tratamiento con antineoplásicos o NPs
- Esferoides con precipitación de NPs.

Criterios de eliminación:

- Pérdida de esferoides durante su recolección.
- Pérdida de esferoides durante el procesamiento con tinción H&E o inmunohistoquímica.

Variables

- Independientes:
 - Efecto antineoplásico
 - Efecto de nanopartículas
- Dependientes:
 - Reacción de inmunohistoquímica (ver tabla 1).

Variables						
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Naturaleza	Escala	Función	Escala de medición
Efecto anti-neoplásico	Efecto citotóxico de fármaco que inhibe el desarrollo, crecimiento y viabilidad de las células.	Número de células vivas que quedaron después del uso del medicamento.	Cuantitativa continua	Razón	Independiente	Viabilidad celular en %
Efecto citotóxico de nanopartículas	Efecto citotóxico de las nanopartículas (entre 50 y 200 nm).	Número de células vivas que quedaron después de la aplicación de las NPs	Cuantitativa continua	Razón	Independiente	Viabilidad celular en %
Reacción de inmunohistoquímica	Reacción inmunoenzimática a través de anticuerpos para detectar antígenos específicos en los tejidos.	Se determinaría el inmunomarcado nuclear de las células	Cualitativa dicotómica	Nominal	Dependiente	Negativo o Positivo

Tabla 1.- Operalización de variables.
Fuente propia.

Metodología

Biopsia y explante de cultivo primario

Se realizó una biopsia de un tumor en la región maxilar derecha de una paciente de 53 años en el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital General de León. La muestra se dividió, enviándole una mitad para examen histopatológico en el Servicio de Diagnóstico Histopatológico (SEDH) y la otra mitad para cultivo celular primario al área de Nanoestructuras y Biomateriales del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, UNAM. El aislamiento de cultivos fue aprobado por el comité de bioética de la Unidad ENES León, UNAM con el código de registro CE_16 004_SN (Imagen 8).

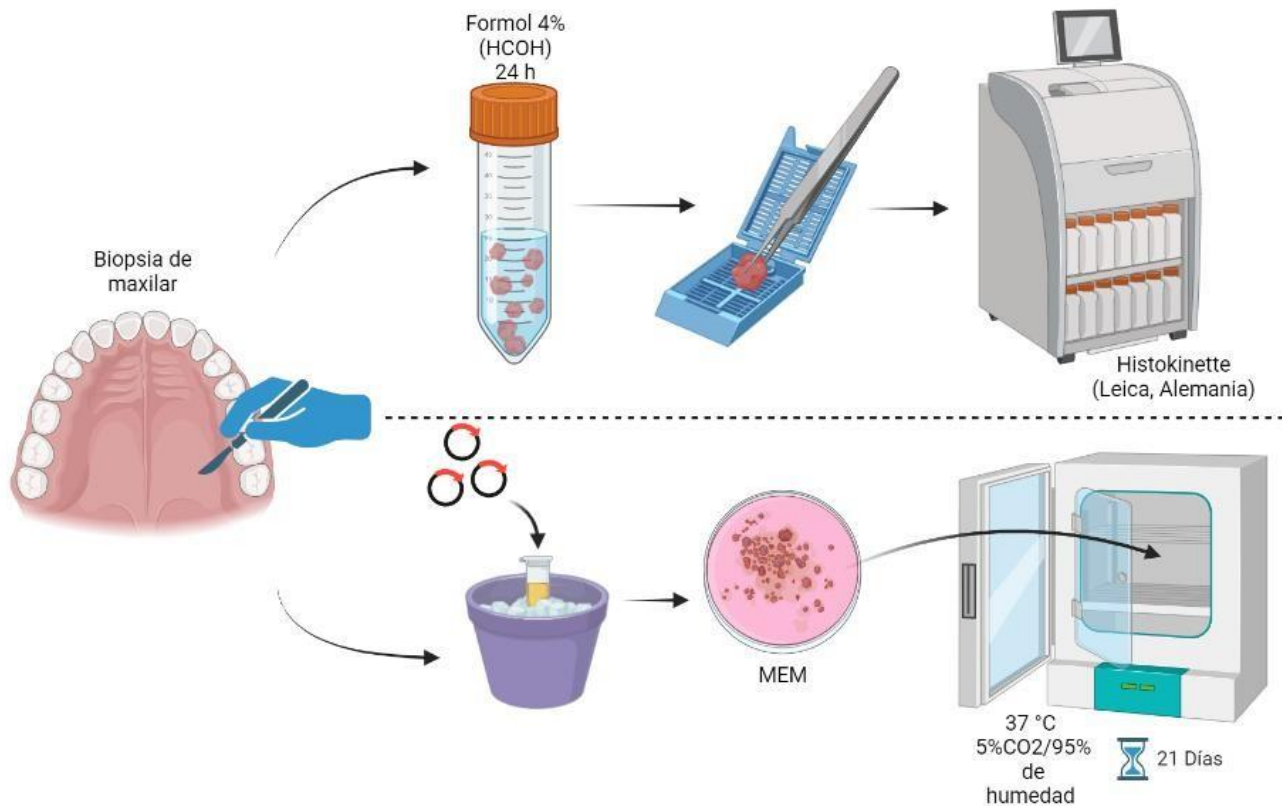


Imagen 8.- Metodología de biopsia y explante primario.
Fuente propia, realizado en BioRender.com

Hallazgos histopatológicos

La biopsia de tejido se sumergió en formalina tamponada al 4 % por un período de 24 horas, luego se trató con Histokinette pasando por alcohol 60 %, alcohol 70 %, alcohol 80 %, alcohol 90 %, alcohol 90 %, alcohol 100 %, alcohol 100 %, alcohol 100 %- xilol, xilol I, xilol II, parafina I, parafina II (Leica, Alemania), se incluyó en parafina y se cortó a 3 micras utilizando un micrótopo (Leica, Alemania). Estas secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron con un microscopio óptico (Imagen 9).

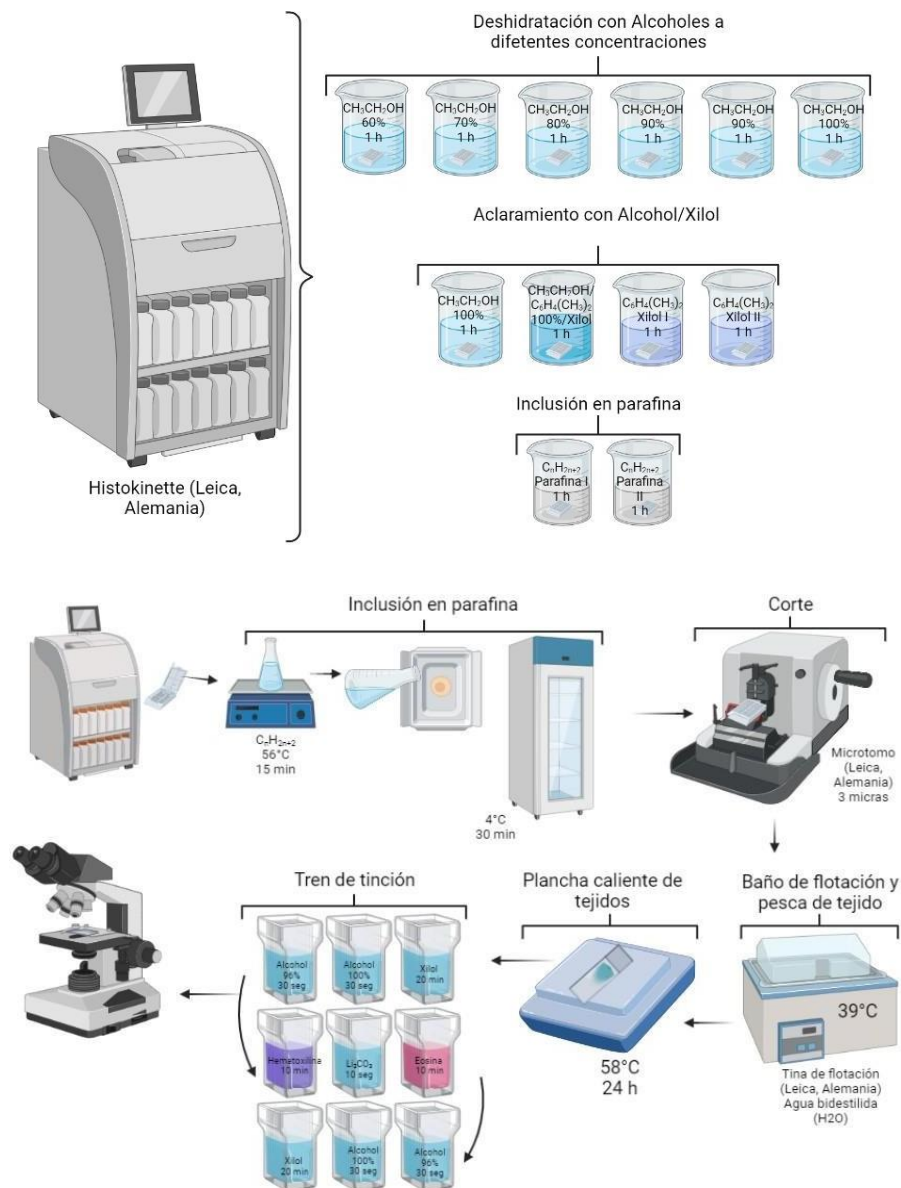


Imagen 9.- Metodología de procesamiento en SEDH.
Fuente propia, realizado en BioRender.com

Cultivo celular primario

Todo el proceso se gestionó dentro de la campana de flujo laminar horizontal (Biobase, China). El tejido se seccionó en explantes de 1x1 mm y se incubó con medio mínimo esencial de águila (MEM, Sigma-Aldrich, MO, EE. % de antibiótico en cajas de Petri de 10 cm de diámetro e incubadas a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad durante 21 días (Imagen 10).

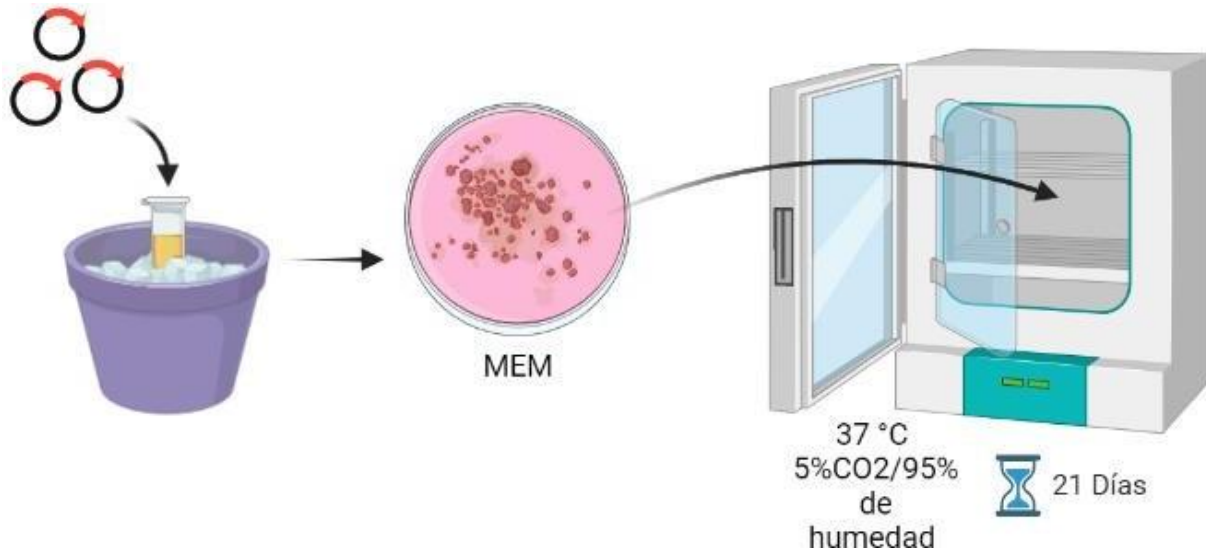


Imagen 10.- Metodología de cultivo primario por explante.
Fuente propia, realizado en BioRender.com

Caracterización celular

Las células de cáncer linfóide presentaban una forma similar a la de un fibroblasto que se desprendió con tripsina EDTA-2Na al 0,025 % en PBS. Las células se cultivaron en subcultivos de medio MEM suplementado. Las células crecieron hasta una confluencia del 90 %, lo que indica una alta tasa de proliferación sobre el cubreobjetos electrocargado. Para caracterizar las células que han sufrido cuatro niveles de duplicación de población (PDL) se consideraron y se realizó inmunocitoquímica utilizando anticuerpos de ciclina D1 y CD3.

Estudio de dosis-respuesta usando cultivo celular 2D

Las células cancerosas se subcultivaron en una microplaca de 96 pocillos durante la noche. Luego, las células se lavaron con PBS y se separaron con tripsina, y se contó el número de células usando un hemocitómetro bajo el microscopio de luz invertida (Leica, Alemania). El subcultivo se realizó con 1×10^5 células/mL durante 48 horas y permitió la unión completa. Posteriormente las células se incubaron con los diferentes fármacos libres (Cis y 5-FU) y compuestos conjugados con NPs a varias concentraciones de 0-1 mg/mL. Los grupos se corresponden de la siguiente manera: 1) MgONPs, (≤ 50 nm), 2) ZnONPs (≤ 50 nm), 3) 5-FU, 4) Cis, 5) 5-FU+MgONPs, 6) 5-FU+ZnONPs, 7) Cis+MgONPs, 8) Cis+ZnONPs durante 24 horas en medio de cultivo fresco. La viabilidad celular se evaluó mediante el método MTT, donde las células se incubaron con Tiazolil Azul Tetrazolio Bromuro durante 7 horas, y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de espectrofotómetro de microplaca (Thermo-scientific, Helsinki, Finlandia). La citotoxicidad se evaluó según la norma ISO 10993-5:2009 y se calculó la concentración citotóxica al 50 % (CC^{50}) para cada grupo (Imagen 11).

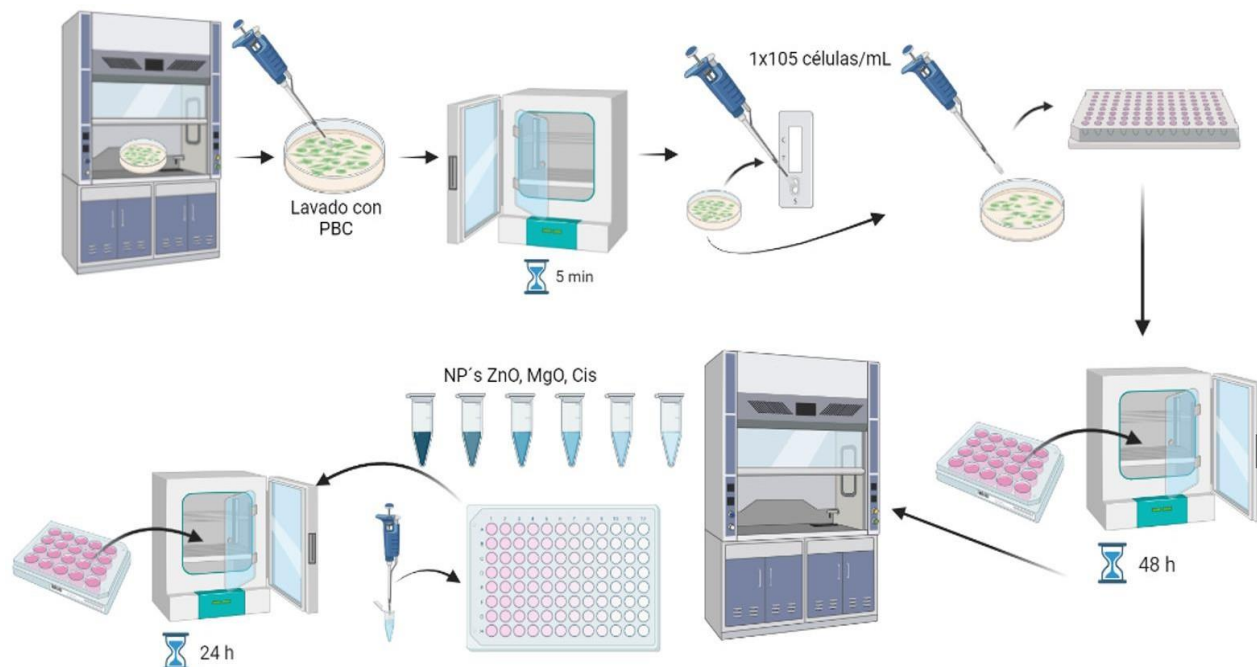


Imagen 11.- Metodología para determinar la dosis citotóxica en modelo 2D.
Fuente propia, realizado en BioRender.com

Formación de esferoides 3D y estudio dosis-respuesta

Los esferoides se formaron utilizando el método de superposición líquida con agarosa al 1,5 % (Sigma-Aldrich, San Louis, EE. UU.). El gel de agarosa se preparó esterilizando en autoclave la solución acuosa de agarosa durante 15 minutos y se añadieron 50 μ l a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se dejó solidificar durante 20 minutos en condiciones estériles. A continuación, las células linfoides se subcultivaron a una concentración de $2,5 \times 10^2$ células/pocillo y se incubaron durante 72 horas. El crecimiento de los esferoides se registró con microscopía de contraste de fase y el medio se reemplazó cada dos días (Imagen 12).

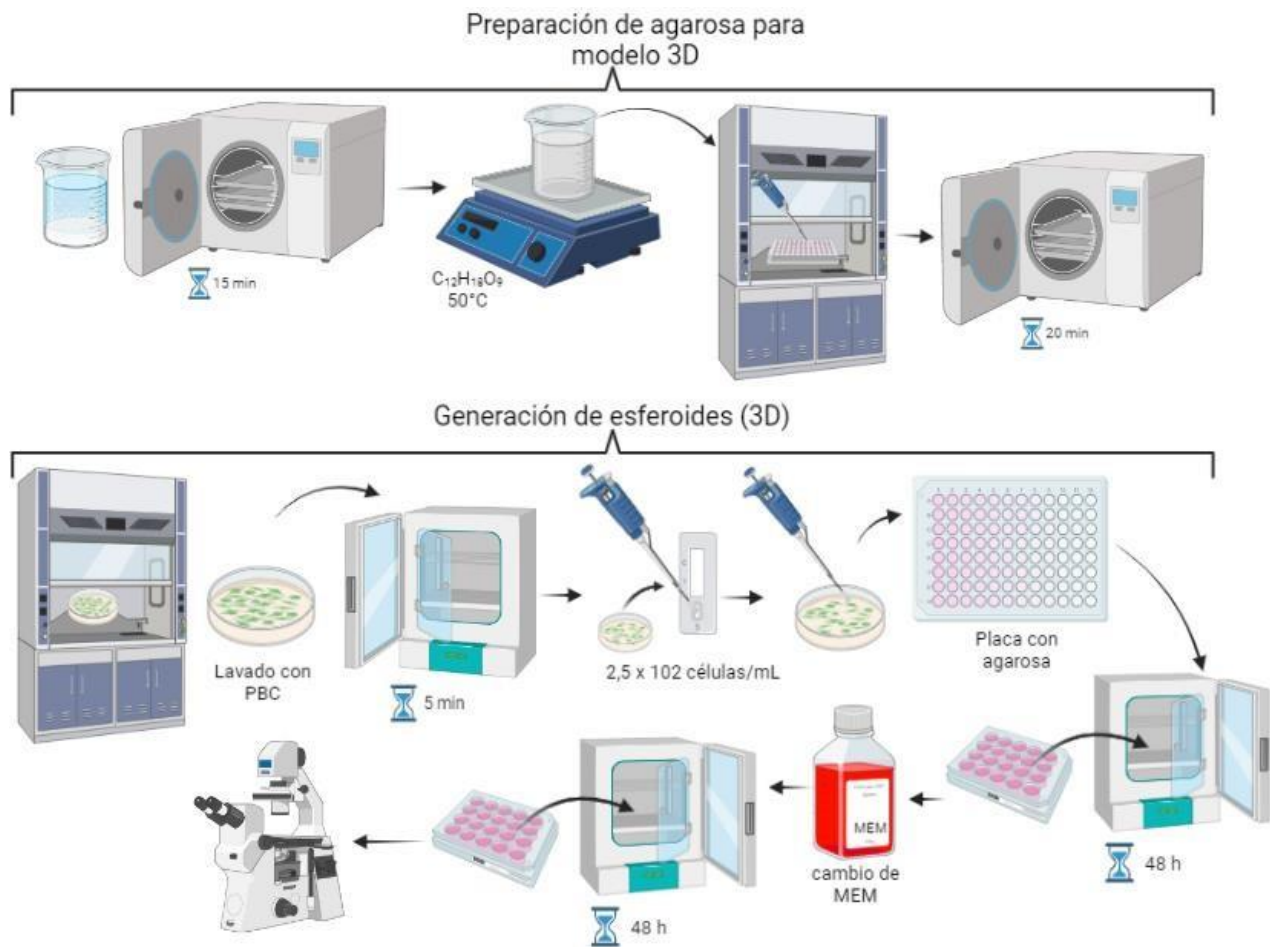


Imagen 12.- Metodología para preparar modelo 3D (esferoides).
Fuente propia, realizado en BioRender.com

Los esferoides se trataron con los compuestos similares mencionados anteriormente, a su dosis CC⁵⁰.

Se obtuvieron 6 grupos de estudio:

1. Grupo de esferoides con nanopartículas de Mg.
2. Grupo de esferoides con nanopartículas de Zn
3. Grupo de esferoides con cisplatino
4. Grupo de esferoides con nanopartículas de Mg y cisplatino
5. Grupo de esferoides con nanopartículas de Zn y cisplatino
6. Grupo control

Posteriormente se evaluaron los esferoides para: 1) MTT, directamente en las placas y 2) Los esferoides recogidos se centrifugaron durante 20 minutos a -4 °C. Posteriormente se fijaron con formalina tamponada al 4 %, luego se procesaron con técnicas de tinción H&E e inmunohistoquímica (Imagen 13).

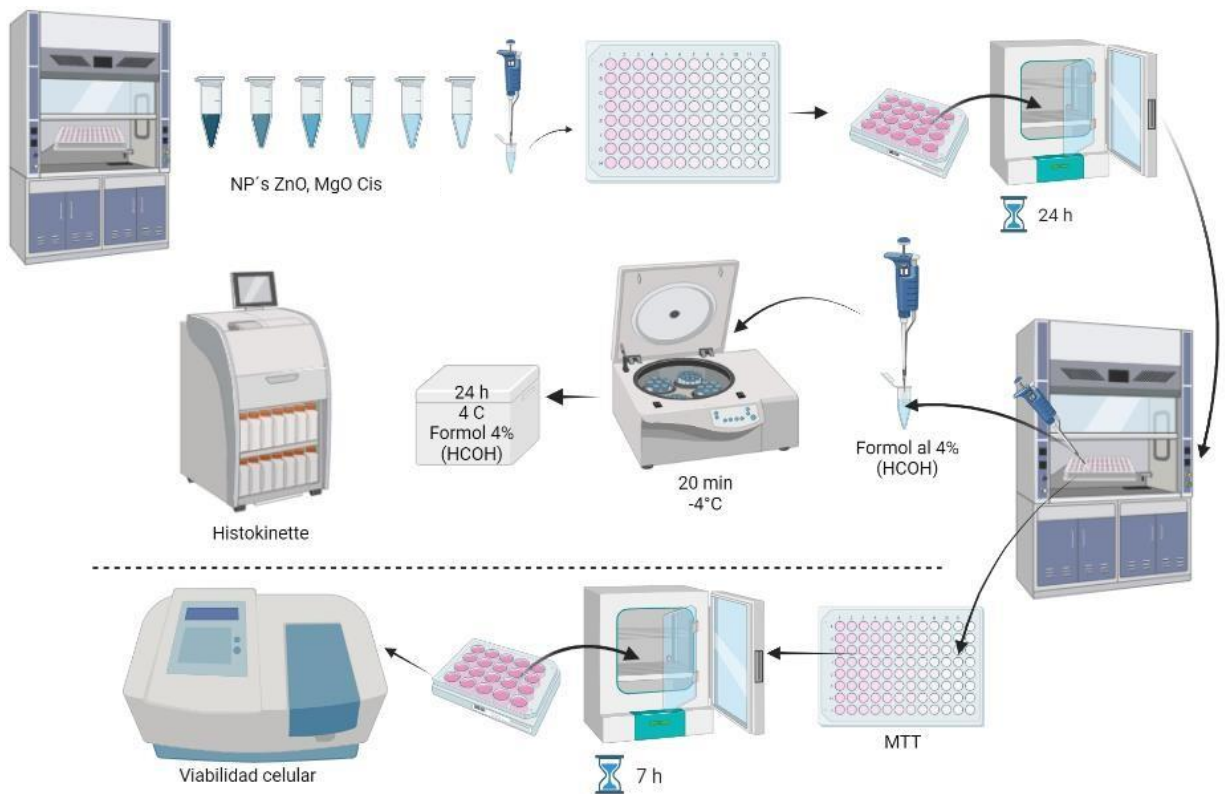


Imagen 13.- Metodología de tratamientos y recolección de esferoides.
Fuente propia, realizado en BioRender.com

Proceso de inmunohistoquímica y tinción H&E

Todos los esferoides se fijaron con formalina tamponada al 4 % durante 24 h, Histokinette pasando por alcohol 60 %, alcohol 70 %, alcohol 80 %, alcohol 90 %, alcohol 90 %, alcohol 100 %, alcohol 100 %, alcohol 100 %-xilol, xilol I, xilol II, parafina I, parafina II (Leica, Alemania), Posteriormente, se incluyeron en parafina y se refrigerado a 4 °C durante 30 min para ser cortado con microtomo (Leica, Alemania) a 3 micras. Las secciones se suspendieron en una tina de baño a 40 °C, se fijaron en portaobjetos de vidrio esmerilado y se dejaron en una placa caliente durante 24 horas. Posteriormente se someten a tren de tinción pasando por xilol al 100 % durante 20 minutos, alcohol al 100 % durante 30 segundos, alcohol al 96 % durante 30 segundos, hematoxilina 10 minutos, carbonato de litio durante 15 segundos, eosina durante 10 minutos, alcohol al 96 % 10 segundos, alcohol al 100 % 10 segundos y xilol al 100 % durante 20 minutos. Por último, se montaron con resina (El crisol, Querétaro, México) y cubreobjetos para su observación a microscopía de luz (Imagen 14).

En el caso de inmunohistoquímica, una vez obtenido el cubo de parafina se realiza un corte con microtomo a 5 micras, se deja flotar en tina de baños con agua destilada a una temperatura de 40 °C, se pescan con un portaobjeto con pegamento enzimático dejándose secar a 60 °C durante 30 minutos y se aplica el inmunomarcador de ciclina D1.

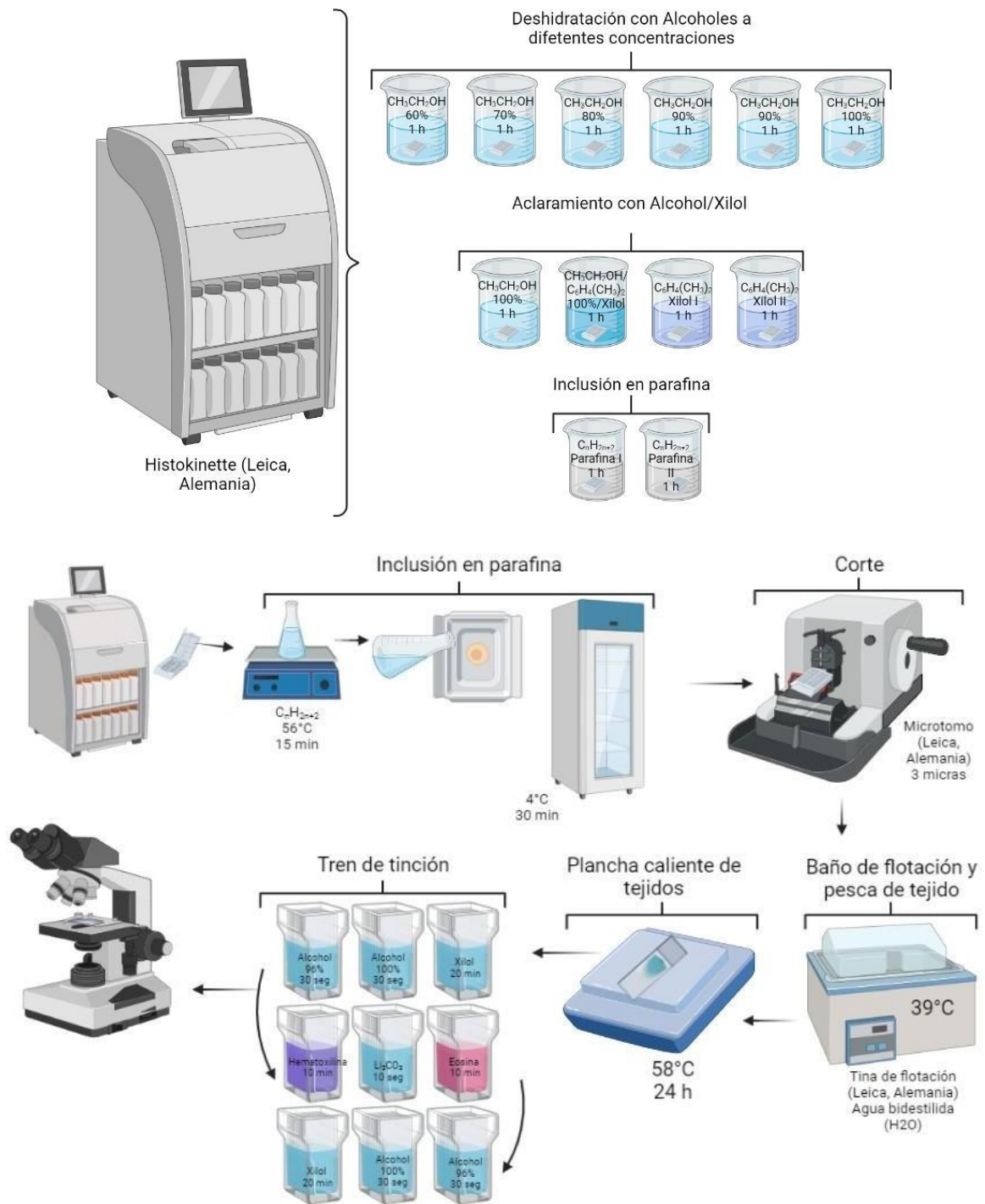


Imagen 14.- Metodología de procesamiento en SEDH de modelo 3D (esferoides).
Fuente propia, realizado en BioRender.com

XI. Resultados

El conjunto de datos incluye la media, el porcentaje y la desviación estándar para un tamaño de muestra de $n=6$, cuya normalidad se probó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se sometió a la prueba ANOVA posthoc de Tukey en el software SPSS V16 (paquete estadístico para ciencias sociales, Chicago, Estados Unidos). Se utilizó un nivel significativo de $p<0,05$ y un nivel de confianza del 95 %.

Resultados de caracterización de cultivo primario con H&E e inmunohistoquímica

El estudio histopatológico resultó en una neoplasia maligna de estirpe linfoide constituida por células plasmáticas pleomórficas y células grandes de núcleo central y escaso citoplasma con formación de centros germinales aislados. El estudio histopatológico dio como resultados positividad fuerte a vimentina (+++) y débil a CD3 (+), siendo consistente con cultivo celular de origen linfoide (Figura 1).

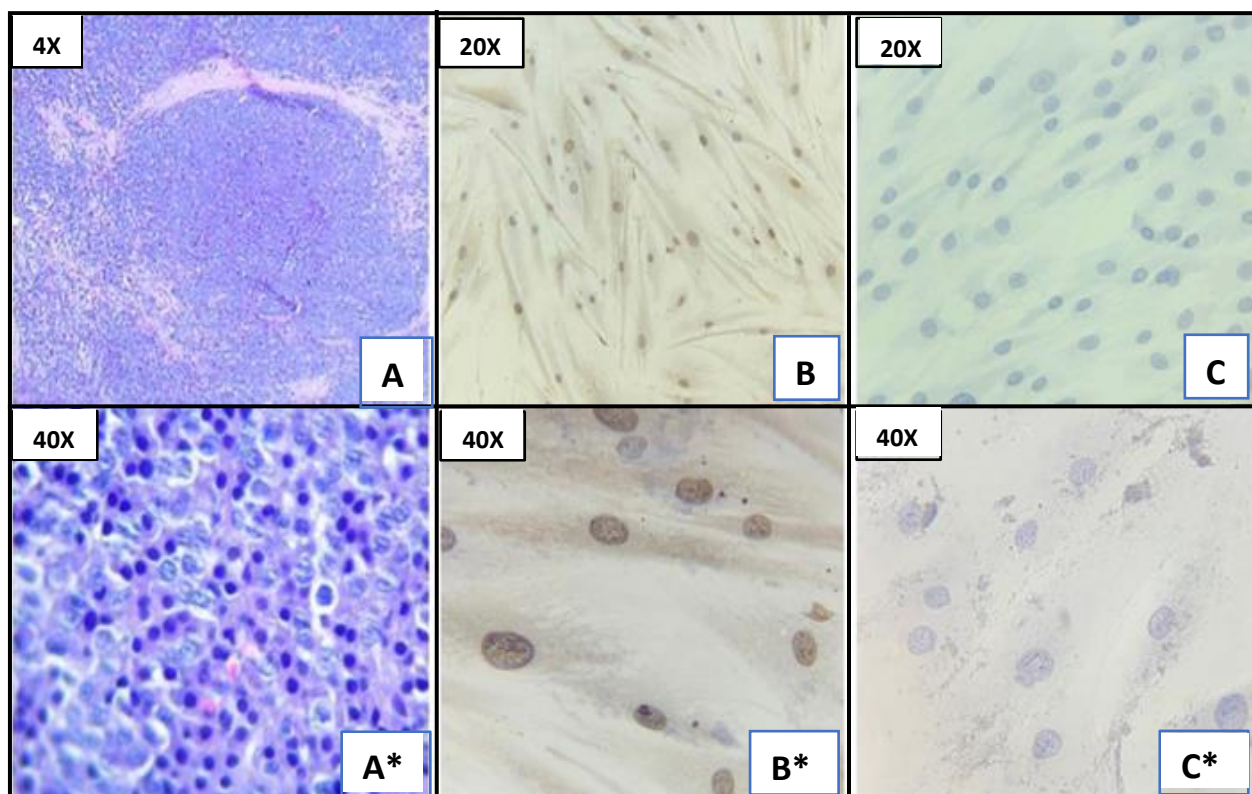


Figura 1.- Estudio histopatológico teñido con H&E de biopsia y caracterización con inmunohistoquímica.
A y A* H&E; B y B* vimentina; C y C* CD3.
Fuente propia.

Resultados para determinar la dosis/respuesta del modelo 2D

Se evaluó la dosis-respuesta de NPs, antineoplásicos y conjugados a diferentes concentraciones con modelo 2D de subcultivo linfoide. A partir de los resultados, se observa que las células de cultivo 2D eran susceptibles a diferentes concentraciones en el siguiente orden: Cis+ZnONPs<ZnONPs<Cis+MgONPs<Cis<MgONPs. Con base en los resultados obtenidos, se determinó la concentración citotóxica al 50 % (CC⁵⁰), mismo que se grafican en Tabla 2 y gráfico 2.

Grupos	CC ⁵⁰
MgO	0.65117164
ZnO	0.04022523
Cis	0.89479548
Cis MgO	0.74236445
Cis ZnO	0.04874103

Tabla 2.- Viabilidad celular con dosis/respuesta en cultivo 2D.
Fuente propia, realizado en Excel.

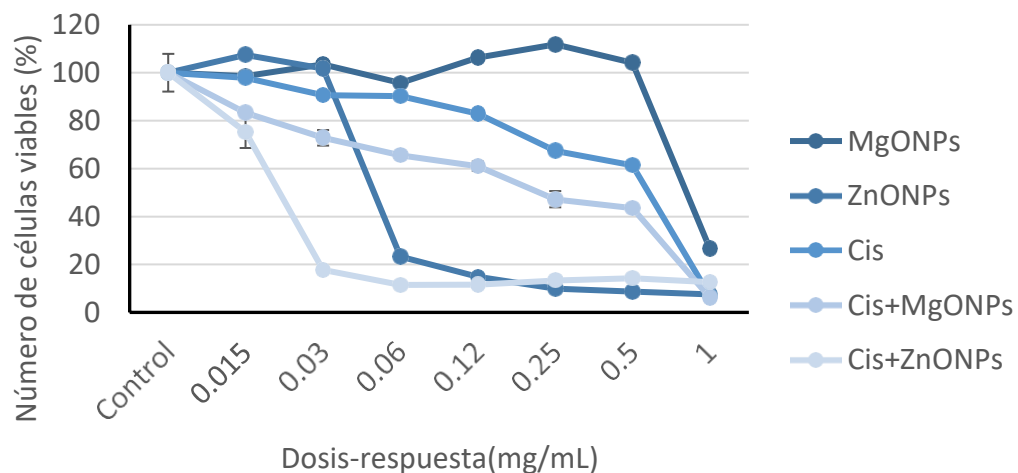


Gráfico 2.- Viabilidad celular en porcentaje a diferentes dosis de antineoplásicos y nanopartículas.
Fuente propia, realizado en Excel.

Resultados de esferoides cultivados

Se monitoreó la formación de esferoides utilizando el método de andamios y luego se seleccionó el tamaño y la morfología adecuados a través de microscopía inversa y tinción con H&E valida la existencia de un grupo de núcleos densamente empaquetados, numerosas células dentro de los esferoides individuales. Así, después del día 4 se eligieron con un tamaño medio de $150 \pm 25 \mu\text{m}$ y forma esférica (Figura 2).

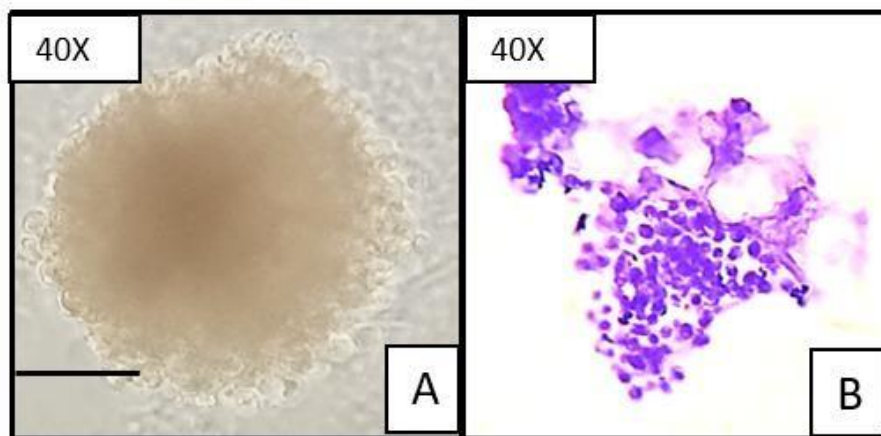


Figura 2.- Esferoides cultivados observados con microscopía inversa (A) y H&E (B).
Fuente propia.

Resultados de esferoides tratados con ensayo MTT

Se usó el efecto antineoplásico del CC^{50} predeterminado del estudio de cultivo celular 2D y se incubó con los esferoides. La dosis de CC^{50} se consideró una concentración del 100 % y se incubó durante 24 horas y se realizó el ensayo de MTT (Tabla 3 y 4).

De los datos, es interesante observar una disminución en la población celular en el siguiente orden:

*ZnONPs=47,4±0,8 %<Cis+MgONPs=53,4±1,51 %<

*5-FU+ZnONPs=57±3,1 %<5FU+MgONPs=69,4±1,2<

*MgONPs=71,9±4,7 %<Cis=72,3±4,1<Cis+ZnONPs=72,4±4,1 %<

*5-FU=84,5±3,8<Control=100±3,9 %.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
GRUPO	36	180	5	6.85714286
DOSIS	36	4.1839	0.116219444	0.0044823

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	429.3236253	1	429.3236253	125.137592	0.00000000000000003073	3.977779393
Dentro de los grupos	240.1568806	70	3.43081258			
Total	669.4805059	71				

Tabla 3.- ANOVA de esferoides tratados.
Fuente propia, realizado en Excel.

Número de células viables (%)

Dosis (%)	Grupos	MgONPs	ZnONPs	Cis	Cis+MgONPs	Cis+ZnONPs
0		100±0.27	100±0.27	100±0.30+	100±0.64+	100±7.88
1.56		98±0.27	107±0.27**+	97±0.30**	83±0.96	75±6.79
3.12		103±0.27**	101±0.27**	90±0.30**	72±3.2	17±0.50
6.25		95±0.27**	23±0.27**+	90±0.30**	65±0.71	11±0.11**
12.5		106±0.27**	14±0.27*	82±0.30**+	61±1.9	11±0.34**
25		111±0.27**	9±0.27**	67±0.30**	47±3.3	13±0.68*
50		104±0.27**	8±0.27**	61±0.30**	43±0.18+	14±0.30**
100		26±0.27**	7±0.27**++	6±0.30**	6±0.17	12±0.57*
Diferencia significativa intragrupos p<0.05* p<0.01**, Diferencia significativa entre grupos p<0.05+ p<0.01++, pos Hoc Tukey 0.05, 95% CI.						

Tabla 4.- Diferencia significativa de esferoides tratados.
Fuente propia. Realizado en Excel.

Tabla 4 . Los esferoides se trataron con dosis de CC⁵⁰ de los diferentes grupos durante 24 h. Después de la incubación, se determinó el número relativo de células de supervivencia viable mediante ensayo MTT. Cada valor representa la media ± de ensayos por triplicado (n=9), *p<0,05, **p<0,01 ANOVA Post-hoc Tukey test. Esto resultó en una disminución significativa en el conteo de células viables (p<0.01), indicando un alto nivel de sensibilidad a los tratamientos en el siguiente orden:

*ZnONPs=47.4±0.8 % <Cis+MgONPs=53.4±1.51 % <5-fu=57±3,1 % <

*MgONPs=71,9±4,7 % <Cis=72,3±4,1<Cis+ZnONPs=72,4±4,1 % <

*5fu=84,5±3,8<Control=100±3,9 %.

Resultados de esferoides tratados observados al microscopio

Para estudiar morfológicamente el efecto de los compuestos mencionados anteriormente, los esferoides se visualizaron bajo un microscopio y se observó un esferoide distorsionado para ZnONPs y Cis de forma menor. Cuando se tiñeron con H&E, se observó la reducción de núcleos como se esperaba, así como la pérdida de conformación esférica. Posteriormente se evaluó con técnica de inmunohistoquímica con inmunomarcador Ciclina D1, donde se observó escaso marcaje del núcleo (Figura 3).

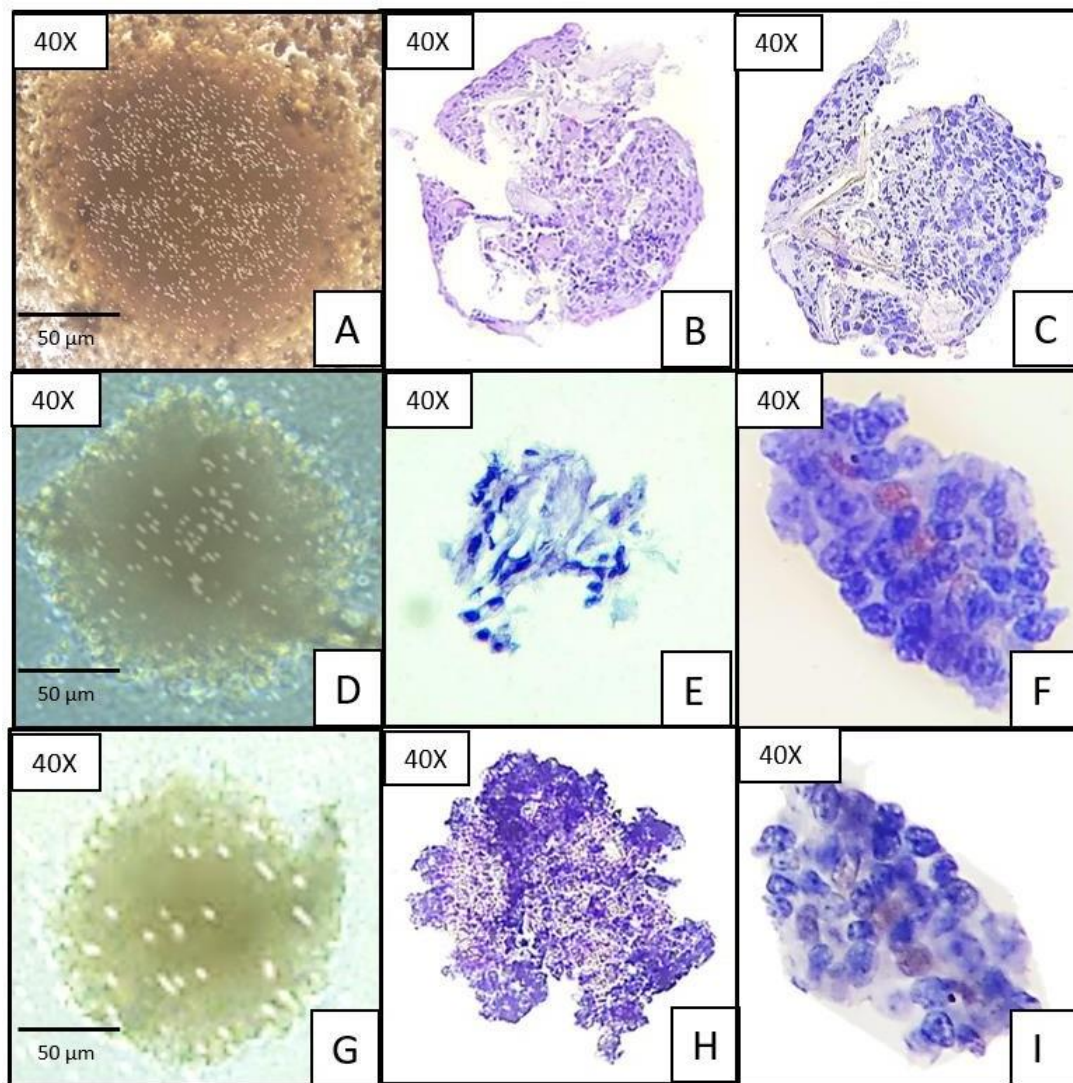


Figura 3.- Esferoides tratados y observados con microscopía inversa de luz (A, D, G); esferoides observados con microscopia de luz y teñidos con H&E (B, E, H) y inmunomarcados con Ciclina D1 (C, F, I).

Fuentes propia.

XII. Discusión

En el presente estudio, se generó un modelo 3D de esferoides de células cancerosas linfoides. Saraiva et al. también generó esferoides usando la técnica de superposición líquida, pero curiosamente informaron que modificar la técnica con un modelo basado en andamios resultó en una mejor formación de esferoides.⁵⁸ Este hallazgo es consistente con nuestros propios resultados, ya que utilizamos un método basado en andamios.

Se realizó un cultivo 2D y 3D para probar la eficacia de tratamiento antineoplásico con cisplatino, ZnONPs y MgONPs y conjugados de NPs y antineoplásico. El cultivo 2D se utilizó para determinar la dosis-respuesta de las células al antineoplásico y NPs. Los resultados encontrados dieron mejores resultados en las células cultivadas a través de esferoides (3D) por su semejanza con los tumores sólidos. Edmoson et al, reconocen las deficiencias que tiene el modelo 2D en comparación con el 3D¹ y Alcántara et al, coinciden al mencionar que el cultivo 3D permite mimetizar las intercomunicaciones célula-célula, célula-matriz extracelular y el microambiente tumoral.²²

Atashi et al, compararon la eficacia de antineoplásicos entre ellos el Cis y descubrió que este, presenta menor resistencia en comparación con otros fármacos. Este descubrimiento es inconsistente con nuestra investigación, donde los esferoides tratados con Cis solo respondieron menos a tratamiento. Además, Atashi et al, también estuvo de acuerdo en que combinar terapias con otros medicamentos sería más eficaz, lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio, donde las NPs conjugadas con Cis fueron más efectivas.⁵⁹

Asimismo, Ghosh realizó un estudio sobre el uso de cisplatino conjugado con nanomateriales, incluidos las nanopartículas inorgánicas como carbono, oro, sílice y óxido de hierro. Su principal objetivo era mejorar la absorción y nanoentrega del fármaco a través de endocitosis en las células.⁶

Abhishek et al, exploraron el potencial de las ZnONPs para tratar varios tipos de cáncer, incluido el de cuello uterino, de mama, cáncer de pulmón y de cabeza y cuello, y encontraron resultados prometedores.⁵² Sin embargo, su revisión destacó la falta de

estudios sobre el uso y eficacia de ZnONPs como nanoportador de fármacos antineoplásicos.

De manera similar, Deng et al, realizaron un estudio sobre esferoides tumorales tratados con doxorrubicina conjugada con ZnONPs y Cu y encontró que los conjugados de antineoplásicos con ZnONPs fueron significativamente más citotóxico a una concentración de 0,01 mg/ml (10 µg/ml).⁶⁰ Por el contrario, Chia et al, compararon la citotoxicidad en un modelo 2D versus 3D de dos líneas celulares cancerígenas diferentes, una de ellas de origen hematológico, y encontró que el modelo 2D fue más susceptible a la citotoxicidad de ZnO en cualquier dosis en comparación con el modelo 3D. Esto debido a que las células de las capas más externas en el modelo 3D exhibieron una capa protectora para el efecto contra la citotoxicidad del ZnO en concentraciones inferiores a 0,5 mg/ml, a diferencia de las células internas del esferoide.⁵⁴ Este hallazgo es consistente con nuestro estudio, donde utilizamos una concentración más baja (0,04 mg/ml) para obtener citotoxicidad.

Mientras que Al-Fahdawi et al, observaron una disminución en el número de células a dosis de 6,12 y 12,5 µg/ml en un cultivo 2D, usando nanopartículas impregnadas de platino⁵⁷, nuestro estudio mostró citotoxicidad significativa a partir de una dosis más alta de 0,25 mg/ml (250 µg/ml), lo que indica diferencias en la efectividad de las dos formulaciones de nanopartículas.

En otro estudio realizado por Franke et al, administraron Cis a través de nanopartículas resultó en una inducción significativa en el daño del ADN en dosis bajas (0,015 mg/ml)⁶¹, este dato se encuentra en contraste con nuestros hallazgos que mostraron un efecto citotóxico a una concentración superior a 0,03 mg/ml, destacando la importancia de comprender los matices de las diferentes formulaciones de medicamentos con nanopartículas para lograr los resultados terapéuticos deseados.

Manisekaran et al, realizaron una revisión exhaustiva de la literatura sobre el uso de NP's MXene como agentes antineoplásicos en un modelo 2D. MXenes son una nueva clase de materiales que han demostrado ser prometedores en diversas aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, incluida su área de superficie, excelente biocompatibilidad y superficie química compatible.⁴²

Los autores de dicho artículo, destacaron varios estudios que demostraron la eficacia de las nanopartículas MXene en el tratamiento de cáncer cuando se utiliza solo o en combinación con otras nanoestructuras. Las nanoestructuras basadas en MXene mostraron mejor inhibición de células cancerosas y apoptosis en comparación con medicamentos de quimioterapia convencionales, este dato, junto con nuestros resultados abre una nueva posibilidad para el uso de antineoplásicos y NP's como terapia antineoplásica.⁴²

XIII. Conclusiones

En conclusión, se creó un modelo 2D a través de un subcultivo celular linfoblástico, a partir de una lesión de cabeza y cuello para obtener la dosis respuesta de antineoplásicos y NPs en esa línea celular, poder observar el efecto citotóxico en un modelo 3D y así enfatizar las diferencias significativas de viabilidad celular de ambos modelos frente al tratamiento de antineoplásicos y NPs. Cabe destacar el impacto de las ZnONPs solas y como nanoportador con Cis frente a las células cancerígenas, siendo una idea prometedora porque es el antineoplásico utilizado como primera línea de quimioterapia en la mayoría de las neoplasias malignas y que en última instancia podrían mejorar el resultado del tratamiento hacia el paciente y su calidad de vida.

El camino de la nanomedicina en terapias cancerígenas avanza a pasos agigantados, por lo que realizar más estudios en esta línea de investigación y su contribución en la literatura, será de utilidad para desarrollar y mejorar técnicas de generación de esferoides con diversas líneas celulares cancerígenas, así como la técnica de procesamiento histológico de dichos esferoides, mismo que es poco utilizada y que generó ligeras complicaciones en este estudio, sin embargo, se logró generar un procesamiento estandarizado para la visualización de los esferoides a través de tinción H&E e inmunohistoquímica, lo que permitió observar a microscopia de luz el efecto a nivel histológico de los antineoplásicos y NPs.

Desde una perspectiva más amplia, los hallazgos de este estudio potencializan el camino para desarrollar más terapias contra el cáncer que sean eficaces y dirigidas a las células cancerosas, así como minimizar el daño a las células y tejidos sanos. El uso de modelos de esferoides 3D en la investigación del cáncer es un avance significativo, ya que imita mejor el complejo microambiente tumoral y proporciona resultados más precisos.

Uno de los puntos importantes sobre los nanoportadores es la absorción por endocitosis mediada, presente en las células cancerosas, por lo que la existencia de varios informes sobre la capacidad de las NPs inorgánicas como nanoportador frente a la actividad anticancerígena, impulsan las líneas de investigación novedosas para el futuro de la nanomedicina.

XIV. Referencias bibliográficas

1. Edmondson R, et al. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies* 2014. 12;4: 207- 218. DOI: 10.1089/adt.2014.573.
2. Ivascu A, Kubbies M. Rapid Generation of Single-Tumor Spheroids for High-Throughput Cell Function and Toxicity Analysis. *Journal of Biomolecular Screening* 2006; 11(8): 922-932. DOI: 10.1177/1087057106292763.
3. Kunz-Schughart L, et al. Proliferative activity and tumorigenic conversion: impact on cellular metabolism in 3-D culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: 765-780. DOI: 10.1152/ajpcell.2000.278.4.C765.
4. Adcock AF, et al. Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro. Evaluation of Anticancer Drugs. *J Anal Bioanal Tech* 2015; 6(3):247. DOI: 10.4172/2155-9872.1000249.
5. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* 2019. DOI: 10.1016/J.bloorg.2019.102925. <https://doi.org/10.1016/J.bloorg.2019.102925>.
6. Dai X et al. A nanodrug to combat cisplatin-resistance by protecting cisplatin with p-sulfonatocalix[4]arene and regulating glutathione S-transferases with loaded 5-fluorouracil. *Chem. Commun* 2019; 55: 7199.
7. Rocca JD, et al. Polysilsesquioxane Nanoparticles for Triggered Release of Cisplatin and Effective Cancer Chemoradiotherapy. *Nanomedicine* 2016; 11(1): 31-38. DOI: 10.1016/j.nano.2014.07.004.
8. Bisht G, Rayamajhi S. ZnO Nanoparticle: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine* 2016; 3:9. DOI: 10.5772/63437.
9. Wang J, et al. Exploration of Zinc Oxide Nanoparticles as a Multitarget and Multifunctional Anticancer Nanomedicine. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017;9: 39971-399984. DOI: 10.1021/acsami.7b11219.

10. SEHH [internet]. Díez (CM): España. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia; c2020; 22 octubre 2020 [consultado 2023]. Disponible en: <https://www.sehh.es/sala-prensa/notas-prensa/124279-hematologos-preven-un-aumento-de-la-incidencia-y-prevalencia-de-los-sindromes-mielodisplasicos?highlight=WyJwcmV2YWxlbnNpYSJd>.
11. WHO [internet]. Cancer today: International Agency for Research on Cancer; c2022; [consultado 2023]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
12. Mowery A, Conlin M, Clayburgh D. Risk of Head and Neck Cancer in Patients With Prior Hematologic Malignant Tumors. JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery 2019; 145 (12): 1121-1127. DOI: 10.1001/jamaoto.2019.1012.
13. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin. 2023;73(1):17-48. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21763>.
14. Chung JC, et al. Secondary head and neck cancer in patients with history of hematological malignancy. HEAD & NECK 2013. DOI 10.1002/hed.23026.
15. Hoarau-Véhot J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer- Microenvironment Interactions?. Int. J. Mol. Sci. 2018; 19: 181. DOI: 10.3390/IJMS190110181. <https://doi.org/10.3390/IJMS190110181>.
16. Calvo-García S. Cultivo de células en 3D. La nueva dimensión de los cultivos celulares. CT 5 2013: 215-232.
17. Lin CJ, et al. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines: Established Models and Rationale for Selection. HEAD & NECK 2007; 29: 163-188. DOI: 10.1002/hed.20478.
18. Beltrán VNE, De la Rosa GCH. Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. UAM 2016. ISBN 978-607-28-0688-7.
19. Kochanek SJ, Close DA, Johnston PA. High Content Screening Characterization of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Multicellular Tumor Spheroid Cultures Generated in 384-Well Ultra-Low Attachment Plates to Screen for Better Cancer Drug Leads. ASSAY and Drug Development Technologies 2019. 17(1): 17-36. DOI: 10.1089/adt.2018.896. <https://doi.org/10.1089/adt.2018.896>.

20. Tenorio-Salazar AJ, Alcantará-Quintana LE. Esferoides Tumorales: Un modelo prometedor para aplicaciones Clínicas. Remdis 2020; 2(12): 28-36. ISSN: 2594-1445.
21. Lee C, et al. Differential Spheroid Formation by Oral Cancer Cells. ANTICANCER RESEARCH 2014; 34: 6945-6950. ISSN: 1791-7530.
22. Alcántara-Quintana LE. Cultivo celular 3D como modelo para estudiar el cáncer. Universitarios Potosinos 2019; 236: 4-10. <https://www.researchgate.net/publication/342654667>.
23. Sievers D, et al. Generation of highly differentiated BHY oral squamous cell carcinoma multicellular spheroids. MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY 2018; 8: 323-325. DOI: 10.3892/mco.2017.1514.
24. Meseguer J, et al. Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. Revista Eubacteria 2015. 34: 15-20. ISSN: 1697-0071.
25. Brand D, et al. Mimicking Tumors: Toward More Predictive In Vitro Models for Peptide- and Protein-Conjugated Drugs. Bioconjugate Chem 2017; 28: 846-856. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00699.
26. Guo Q, et al. Multifunctional microfluidic chip for cancer diagnosis and treatment. Nanotheranostics 2021; 5 (1): 73-86. DOI: 10.7150/ntno.49614.
27. Zhao H, Jiang E, Shang Z. 3D Co-culture of Cancer-Associated Fibroblast with Oral Cancer Organoids. Journal of Dental Research 2021. 100(2): 201-208. DOI: 10.1177/002203450956614. <https://doi.org/10.1177/002203450956614>.
28. Ezquerro S, et al. Functional Properties of Human-Derived Mesenchymal Stem Cell Spheroids: A Meta-Analysis and Systematic Review. Stem Cells International 2021. DOI: 10.1155/2021/8825332.
29. Niculescu A-G, Grumezescu AM. Novel Tumor- Targeting Nanoparticles for Cancer Treatment: A Review. Int. J. Mol. Sci. 2022; 23, 5253. <https://doi.org/10.3390/ijms23095253>.

30. Brunton LL. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 12va edición. Mexico: Mc Graw Hill; 2001. 1667-1730.
31. Rosiñol L, et al. Expert review on soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: definition, disease assessment and treatment considerations. *British Journal of Haematology* 2021; 194: 496-507. DOI: 10.1111/bjh.17338.
32. Jin Z, et al. Immune-checkpoint inhibitor plus chemotherapy versus conventional chemotherapy for treatment of recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and network meta- analysis. *Ther Adv Med Oncol* 2020; 12: 1-12. DOI: 10.1177/1758835920983717.
33. Asadi MR, et al. Stress Granules in the Anti-Cancer Medications Mechanism of Action: A Systematic Scoping Review. *Front. Oncol* 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.797549.
34. Wang LA. Deficient DNA damage signaling leads to chemoresistance to cisplatin in oral cancer. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(11): 2401-2409. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0448.
35. Wang L, et al. The Role of Tumour Metabolism in Cisplatin Resistance. *Front. Mol. Biosci.* 2021. DOI: 10.3389/fmolb.2021.691795.
36. Liu Y et al. Paclitaxel plus cisplatin vs 5-fluorouracil plus cisplatin as first-line treatment for patients with advanced squamous cell esophageal cancer. *AmJ Cancer Res* 2016; 6(10): 2345-2350. ISSN: 2156-6976/ajcr0037407.
37. Hasegawa Y, et al. Predictive biomarkers for combined chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in oro- and hypopharyngeal cancers. *MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY* 2018; 8: 378-386. DOI: 10.3892/mco.2017.1521.
38. Bukowski K, Kciuk M and Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci* 2020; 21. DOI: 10.3390/ijms21093233.
39. Toocheck C and Pinkhas D. Treatment of relapsed multiple myeloma complicated by cardiac extramedullary plasmacytoma with D-PACE chemotherapy. *BMJ Case Rep* 2017. DOI: 10.1136/bcr-2017-223611.

40. Komatsu M, et al. Concurrent Chemoradiotherapy with Docetaxel, Cisplatin and 5-Fluorouracil (TPF) in Patients with Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Jpn J Clin Oncol* 2014; 44 (5): 416-421. DOI: 10.1093/jjco/hyu026.
41. Nikolova MP, Chavali MS. Metal Oxide Nanoparticles as Biomedical Materials. *Biomimetics* 2020; 5 (27). DOI: 10.3390/BIOMIMETICS5020027. <https://doi.org/10.3390/biomimetics5020027>.
42. Manisekaran R et al. State-of-the-art:MXene structures in nano-oncology. *Biomaterials Advances* 147 (2023) DOI: 10.1016/j.bioadv..2023.213354. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213354>.
43. Urrejola MC. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas I: Biodetección y Monitorio de Glucosa en Diabetes a Bioimagen, Nano-Oncología, Terapia Génica, Ingeniería de Tejidos /Regeneración a Nano-Odontología. *Int. J. Morphol* 2018; 36 (4): 1490-1499.
44. García-Contreras R, et al. Effects of TiO₂ Nanoparticles on Cytotoxic Action of Chemotherapeutic Drugs Against a Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line. *In vivo* 2014; 28: 209-216.
45. Wiesmann N, Tremel W, Brieger J. Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. *J Mater Chem B Mater Biol Med* [Internet]. 2020;8(23):4973–89. DOI: 10.1039/d0tb00739k. <http://doi.org/10.1039/d0tb00739k>.
46. Canta M and Cauda V. The investigation of the parameters affecting the ZnO nanoparticles cytotoxicity behaviour: a tutorial review. *Biomater Sci* 2020; 8 (22): 6157-6174. DOI: 10.1039/d0bm01086c.
47. Song W, Jia P, Zhang T, et al. Cell membrane-camouflaged inorganic nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology* 2022; 20: 289. DOI: 10.1186/s12951-022-01475-w. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01475-w>.
48. Al-Zoubi MS, Al-Zoubi RM. Nanomedicine tactics in cancer treatment: Challenge and hope. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 2022; 174. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103677. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103677>.
49. Shukla S, et al. Affinity of plant viral nanoparticle potato virus X (PVX) towards

- malignant B cell enables cancer drug delivery. *Biomater. Sci.* 2020;8: 3935-3943. DOI: 10.1039/d0bm00683.
50. Hornak J. Synthesis, Properties, and Selected Technical Applications of Magnesium Oxide Nanoparticles: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22. DOI: 10.3390/ijms222312752.
 51. Conti M, et al. Anticancer Drug Delivery with Nanoparticle. *In vivo* 2006; 20: 697-702.
 52. Abhishek S, Das J, Sil PC. Zinc oxide nanoparticles: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks. *Advances in Colloid and Interface Science* 2020. DOI 10.1016/J.cis.2020.102317.
 53. Deng H, et al, Multifunctional ZnO@CuS nanoparticles cluster synergize chemotherapy and photothermal therapy for tumor metastasis. *Nanomedicine: NBM* 2021; 34:102399, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102399>.
 54. Chia SL, et al. Biomimicry 3D Gastrointestinal Spheroid Platform for the Assessment of Toxicity and Inflammatory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles. *Small* 2015; 6: 702-712.
 55. Buyana B, et al. Nanoparticles Loaded with Platinum Drugs for Colorectal Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. DOI: 10.3390/ijms231911261
 56. Mori H, Tack J, Suzuki H. Magnesium Oxide in Constipation. *Nutrients* 2021;13 (421). DOI: 10.3390/nu13020421.
 57. Al-Fahdawi MQ, et al. Oxidative stress cytotoxicity induced by platinum- doped magnesia nanoparticles in cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021; 138. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111483>.
 58. Saraiva DP, Matias AT, Braga S, Jacinto A, Cabral GM. Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient- Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies. *Front. Oncol.* 10: 1543. DOI: 10.3389/fonc.2020.01543.
 59. Atashi F, Vahed N, Emamverdizabeh P, Fattahi S, Paya L. Drug resistance

- against 5-fluorouracil and cisplatin in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2021; 15 (3): 219-225. DOI: 10.34172/joddd.2021.036.
60. Deng H, et al, Multifunctional ZnO@CuS nanoparticles cluster synergize chemotherapy and photothermal therapy for tumor metastasis. *Nanomedicine: NBM* 2021; 34:102399, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102399>.
61. Franke CE, Czapar AE, Patel RB, Steinmetz NF. Tobacco Mosaic Virus-Delivered Cisplatin Restores Efficacy in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Cells. *Mol. Pharmaceutics* 2018; 15: 2922-2931. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00466. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00466>.

XV. ANEXOS

in vivo 37: 1658-1665 (2023)
doi:10.21873/invivo.13251

Efficacy of Antineoplastic Nanocarriers on 3D Oral Cancer Spheroids

NANCY LETICIA MENDOZA-MARTINEZ^{1*}, AYLIN DIVINA CADENA-GALEANA^{1*},
FRANCISCO GERMAN VILLANUEVA-SANCHEZ¹, NANCY PEREZ-CORNEJO¹,
KARLA MAYELA AVELAR-JUAREZ¹, JOSE DAVID RAMOS-BAENA¹,
EDUARDO ALONSO CRUZ-MONROY¹, ULISES VAZQUEZ-ZUNIGA¹ and RENE GARCIA-CONTRERAS²

¹Oral and Maxillofacial Pathology Area, and ²Nanostructures and Biomaterials Area,
Interdisciplinary Research Laboratory (LII), National School of Higher Studies (ENES),
Leon Unit, National Autonomous University of Mexico (UNAM), León, México

4.0

RI Score ⓘ

70

Reads ⓘ

0

Recommendations

1

Citations

[View weekly stats report](#)

Research Interest Score

Total score: 4.0



Score breakdown

- 12.66% Citations
- 0.00% Recommendations
- 49.37% Full-text reads
- 37.97% Other reads

[View details](#) >

Compared to all ResearchGate members



Your Research Interest Score is higher than 18% of ResearchGate members.

Compared by date of first publication



Your Research Interest Score is higher than 68% of ResearchGate members who first published in 2023.