



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**EFFECTO DEL 5-FLUOROURACILO CON NANOPARTÍCULAS DE  
ÓXIDO DE ZINC Y MAGNESIO EN UN CULTIVO CELULAR DE  
CÁNCER ORAL**

## **TESIS**

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

PRESENTA:

**AYLIN DIVINA CADENA GALEANA**

TUTORA PRINCIPAL:

ESP. NANCY PÉREZ CORNEJO

ADSCRITA AL POSGRADO DE ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA ORAL Y  
MAXILOFACIAL, ENES UNIDAD LEÓN, UNAM.

ASESOR:

DR. RENÉ GARCÍA CONTRERAS

ADSCRITO AL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN BIOMATERIALES  
DENTALES, ENES UNIDAD LEÓN, UNAM.

**MÉXICO, LEÓN GUANAJUATO, JUNIO, 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.

## **CONTENIDO**

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIAS	4
INTRODUCCIÓN	5
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1. Neoplasias de cabeza y cuello	6
1.1.2 Neoplasias hematolinfoides de cabeza y cuello	7
1.2. Fármacos antineoplásicos	8
1.2.1. Tratamiento con quimioterapia para el cáncer oral	9
1.3. Aplicación de las nanopartículas	10
1.3.1. Nanotecnología en el tratamiento oncológico	11
1.4. Cultivos celulares y su clasificación	15
1.4.1. Cultivos celulares, cultivos 3D y sus aplicaciones	16
2. ANTECEDENTES	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
7. HIPÓTESIS	22
8. MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1 Diseño metodológico	22
8.2 Variables	23
8.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	24
8.4 Sustancias químicas y reactivos	24
8.5 Muestra de biopsia de tejido	24

	3
8.6 Hallazgos histopatológicos	25
8.7 Cultivo celular primario	26
8.8 Caracterización celular	26
8.9 Preparación de solución stock y nanocarreadores	27
8.10 Estudio de dosis-respuesta usando cultivo celular 2D	28
8.11 Formación de esferoides y estudio dosis-respuesta	29
8.12 Proceso de inmunohistoquímica y tinción H&E	29
8.13 Análisis estadístico	31
9. RESULTADOS	31
9.1 Hallazgos histopatológicos y cultivo celular primario	32
9.2 Compuestos y nanoportadores dosis-respuesta	33
9.3 Aplicación de compuestos y nanocarreadores a los esferoides	34
10. DISCUSIÓN	37
11. CONCLUSIÓN	38
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
13. ANEXOS	43

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por poner en mi camino las herramientas y ser guía en la toma de decisiones durante mi camino de vida, a mis padres Francisco Cadena Hernandez y Rosario Galeana Villalobos por apoyar cada uno de mis proyectos, y hacer de mis sueños los suyos, a mi novio y ahora esposo Martin Alejandro Heras Gutierrez por la motivación a seguir cada una de mis metas, a la Escuela Nacional de Estudios superiores, UNAM, León por la oportunidad de realizar mi especialidad y convertirse en mi alma mater, a mis profesores que admiro y respeto tanto, de los cuales me llevo grandes enseñanzas, Karla Avelar, Germán Villanueva, Eduardo Cruz, David Ramos, Ravichandra Manisekaran, Paloma Serrano, Alejandra Chávez, Benjamín Aranda, Christian Andrea, Andres Ayala, Alberto Flores, a mi profesora y tutora de tesis, la Esp. Nancy Pérez Cornejo y a mi asesor el Dr. René García Contreras, que me enseñaron a ver la ciencia e investigación de una manera diferente, a mis compañeros amigos que hice a lo largo de la especialidad en especial a Ilse Rodriguez por el acompañamiento tan ameno y su apoyo durante la especialidad, y al apoyo económico de la UNAM-DGAPA-PAPIME No. PE201622 así como también al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto con el programa de becas nacionales para la formación en áreas de atención prioritaria.

## **DEDICATORIA**

A mis padres por su amor y apoyo incondicional a lo largo de este viaje académico, a mis hermanos por la motivación cada día, a mi novio ahora esposo que su presencia fue un pilar de fortaleza, a mi familia por siempre estar en los momentos más importantes aun a la distancia.

IN MEMORIAM

En honor a mis abuelos Francisco Cadena, Divina Hernández, Cristina Villalobos e Ismael Galeana, aunque ya no estan físicamente conmigo su espíritu y amor continúan guiándome en cada paso.

## INTRODUCCIÓN

En condiciones normales, las células del cuerpo humano se forman y multiplican en el proceso de división celular, creando nuevas células que reemplazarán las células muertas o dañadas, en ocasiones dicho proceso no sigue el orden correcto, debido a cambios genéticos causados por errores que ocurren cuando se están multiplicando las células, así como daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) o por herencia, y las células dañadas o anormales se multiplican sin control dando como resultado el cáncer <sup>1</sup>.

El cáncer es una enfermedad que ha planteado numerosos desafíos terapéuticos, actualmente exige nuevos enfoques que superen los tratamientos convencionales que desencadenan efectos secundarios no deseados en los pacientes.

La nanotecnología se ha convertido en una opción prometedora para el tratamiento del cáncer gracias a su capacidad de manipular los materiales a parámetro nanoescala, apoyados también de las propiedades fisicoquímicas de estos. Los nanoportadores encapsulan agentes terapéuticos como medicamentos o genes teniendo una precisión puntual en el objetivo que son las células cancerosas superando en varios ámbitos las terapias convencionales <sup>2,3</sup>.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) y de magnesio (MgONPs), tanto de forma individual como conjugadas con el 5-Fluorouracilo, en un cultivo primario de esferoides de células de origen linfóide bucal, con el fin de evaluar su potencial acción antineoplásica.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Neoplasias de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello está posicionado en el número dieciséis de las neoplasias más comunes a nivel mundial, y del total de los casos, >90% son carcinomas de células escamosas. El 10% restante corresponde a los tumores malignos odontogénicos, de glándulas salivales menores, linfomas, sarcomas y melanomas <sup>4,5</sup>.

Debido a la cantidad de tipos de cáncer que afectan cabeza y cuello, se clasifican por ubicación anatómica usando la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla1).<sup>5</sup>

Sitio principal	ICD-10	Sitio principal	ICD-10
Neoplasias malignas de labio	C00	Neoplasia maligna de orofaringe	C10
Neoplasia maligna de base de lengua	C01	Neoplasia maligna de nasofaringe	C11
Neoplasia maligna de otra parte de lengua no especificada	C02	Neoplasia maligna del seno piriforme	C12
Neoplasia maligna de encía	C03	Neoplasia maligna de hipofaringe	C13
Neoplasia maligna de suelo de boca	C04	Neoplasia maligna de otros sitios mal definidos de labio, cavidad bucal y faringe	C14
Neoplasia maligna de paladar	C05	Neoplasia maligna de cavidad nasal y oído medio	C30
Neoplasia maligna de otras partes de boca sin especificar	C06	Neoplasia maligna de senos accesorios	C31
Neoplasia maligna de glándula parótida	C07	Neoplasia maligna de laringe	C32
Neoplasia maligna de otras glándulas salivales mayores y no especificadas	C08	Neoplasia maligna de otros sitios mal definidos	C76
Neoplasia maligna de amígdala	C09		

**Tabla1. Subsitios anatómicos de la cabeza y cuello según la CIE-10.** Fuente: Tomado de Gormley <sup>5</sup>.

### 1.1.2. Neoplasias hematolinfoides de cabeza y cuello

En cabeza y cuello las neoplasias hematolinfoides son diagnosticadas con frecuencia, en localizaciones nodales y extranodales. En este gran grupo se incluyen los trastornos linfoproliferativos de células T, los linfomas extranodales de células *Natural Killer* (NK) y de células T, plasmocitoma extraóseo, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Hodgkin (LH) clásico, LH con predominio linfocítico nodular, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma y leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células T, linfoma de células B de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), sarcoma de células dendríticas foliculares, linfoma plasmablastico, histiocitosis de células de Langerhans y el sarcoma mieloides intraoral <sup>6</sup>. En la quinta edición de la Clasificación de Tumores de Cabeza y Cuello de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se realizó una reestructuración de las neoplasias hematolinfoides en comparación con la edición previa, y se incluyeron al listado las proliferaciones linfoides reactivas (Tabla 2) <sup>7</sup>.

<b>Tumores hematolinfoides (5ª edición)</b>
1. Prólogos e introducciones
2. Capítulo 2: Proliferaciones y neoplasias mieloides
3. Capítulo 3: Neoplasias de células histiocíticas/dendríticas
4. Capítulo 4: Proliferaciones linfoides de células B y linfomas
5. Capítulo 5: Proliferaciones y linfomas de células T y NK
6. Capítulo 6: Neoplasias de tejidos linfoides derivadas de la estroma
7. Capítulo 7: Síndromes de tumores genéticos asociados con tumores hematolinfoides

**Tabla 2. Clasificación de Tumores hematolinfoides (5ª edición OMS).** Fuente: Tomado de Clasificación de Tumores de la Organización Mundial de Salud.

Los tumores hematolinfoides representan un grupo muy heterogéneo de neoplasias que deben ser consideradas como diagnóstico diferencial de masas encontradas en la mucosa oral u orofaríngea, los ganglios linfáticos cervicales o en la mandíbula.

La presentación extranodal de las neoplasias hematolinfoides pueden involucrar las amígdalas palatinas, glándulas salivales, nasofaringe, y estructuras óseas como la mandíbula y maxilar <sup>6</sup>.

Entre los principales factores de riesgo se incluyen el consumo excesivo de tabaco, alcoholismo, la combinación de estos, el consumo de drogas, la dieta, historia familiar y factores socioeconómicos <sup>5</sup>.

Por lo general, son los dentistas y especialistas en odontología quienes más frecuentemente refieren a un nivel de atención más especializado a los pacientes con cáncer oral. Una mitad de los casos de cáncer oral se diagnostican en etapas avanzadas, ya que tiende a ser asintomático en las primeras etapas. Esta enfermedad presenta una diseminación rápida, con invasión a tejidos cercanos, cadenas ganglionares y producción de metástasis. El cáncer oral puede causar dolor crónico, alteraciones en la apariencia facial, parestesia, dificultades en el habla y la deglución, así como llevar a aislamiento social. El pronóstico del cáncer oral es desfavorable, con una supervivencia a cinco años del 40% en estadios avanzados, y del 80% si se detecta en etapas tempranas <sup>4,5</sup>.

Cada paciente con cáncer debe ser tratado desde un enfoque multidisciplinario para ofrecerle un plan adecuado y personalizado. Dependiendo de la localización y tipo se valora para ser tratado con cirugía, y a menudo se indica radioterapia (RT) postoperatoria adyuvante en el caso del cáncer de cavidad oral. Sin embargo, la decisión de tratamiento depende en gran medida del resultado histopatológico final y del estadio; la quimioterapia (QT) se agrega a la RT si se identifica extensión extracapsular de la enfermedad nodal <sup>8</sup>.

## 1.2. Fármacos antineoplásicos

Las terapias antineoplásicas son intervenciones médicas desarrolladas con el propósito de prevenir, detener o revertir el crecimiento y la propagación de células cancerosas. Este conjunto de tratamientos abarca diversas modalidades, entre los abordajes convencionales se encuentra la RT, que emplea radiación ionizante para dañar o destruir las células, impidiendo su capacidad de reproducción y crecimiento,

y la QT, basada en el uso de medicamentos citotóxicos para eliminar las células neoplásicas. Entre las terapias más novedosas se enlista la inmunoterapia, las terapias dirigidas o moleculares, las terapias hormonales, la terapia con células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR), las terapias con radionúclidos, la terapia genética, y la aplicación de la nanotecnología en el área oncológica <sup>9</sup>.

### 1.2.1. Tratamiento con quimioterapia para el cáncer oral

La efectividad de la QT en el cáncer oral se potencia cuando se emplea en conjunto con otras formas de tratamiento, especialmente la RT. En el tratamiento inicial del cáncer oral de células escamosas (90% de los casos), se emplea la QT con fármacos como cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), docetaxel, paclitaxel (PTX) y metotrexato (MTX). El fármaco cetuximab, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se utiliza como parte del tratamiento del cáncer oral en situaciones específicas. Esta terapia dirigida puede combinarse con la RT o la QT, o incluso como tratamiento único <sup>10</sup>.

- **5 Fluorouracilo**

El 5-FU es un medicamento antimetabolito aprobado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Es utilizado como agente terapéutico contra los carcinomas de células escamosas en cabeza y cuello, en cérvix y en esófago. Su mecanismo de acción implica la integración de metabolitos en el ácido ribonucleico (ARN), lo que inhibe la timidilato sintasa, bloqueando así la replicación en las células tumorales <sup>(9)</sup>. Generalmente, el 5-FU se administra en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos, lo que potencia el efecto citotóxico en el tumor. Estos medicamentos quimioterapéuticos requieren dosis muy altas, ya sea cuando se administran solos o en combinación, lo que conlleva el desarrollo de efectos secundarios serios, como toxicidad neurológica, encefalopatía hiperamonémica, mielosupresión, mucositis y cardiotoxicidad, entre otros. Por ende, para enfrentar estos problemas, se han introducido nuevas tecnologías como la nanotecnología y la nanomedicina <sup>9</sup>.

### 1.3. Aplicación de las nanopartículas

La nanotecnología es la aplicación del campo de estudio de la nanociencia, es decir, donde se manipula la materia a niveles moleculares y atómicos. Por la investigación científica sobre diferentes tipos de nanopartículas (NP), así como la aplicación de nuevos nanomateriales y nanodispositivos en numerosas áreas de interés humano, la nanotecnología posee una base y proyección multidisciplinaria. En el ámbito de la medicina y odontología se reconoce que existen obstáculos que pueden llegar a ser solventados con las propuestas novedosas de materiales y estructuras de 1 a 100 nm que la nanociencia y nanotecnología pueden ofrecer <sup>11</sup>.

Además de la síntesis de tejidos, el desarrollo de biomateriales y dispositivos médicos, sistemas de biofiltración y ensamblaje robótico, las NP han abierto las puertas a la posibilidad de garantizar métodos de entrega eficaz y precisa de fármacos a células tumorales, sin la afectación sistémica que las terapias oncológicas convencionales presentan. Una tarea desafiante, ya que se requiere un sistema de liberación que sea capaz de transportar los medicamentos de manera dirigida hasta el sitio de acción <sup>11</sup>.

Por otro lado, la nanotecnología puede proveer alternativas para el caso de la polifarmacia, a través del uso de múltiples fármacos combinados en un solo vehículo para potenciar el tratamiento y reducir la aparición de resistencia a los medicamentos. La combinación de diferentes agentes terapéuticos puede ser beneficiosa para abordar la heterogeneidad de los tumores y aumentar la eficacia del tratamiento. Sin embargo, esto también puede aumentar la toxicidad y el daño colateral, por lo que se requiere un cuidadoso equilibrio en la selección y administración de los mismos. En este contexto, es crucial el diseño y la producción de métodos inteligentes que actúen como vehículos para los fármacos oncológicos <sup>11</sup>.

El estudio de la nanotecnología para su aplicación en la medicina se ha incrementado exponencialmente en los recientes años, lo que se ve reflejado en las nuevas propuestas de nanoacarreadores, diversos en materiales y características,

que ya se han utilizado en estudios *in vitro* e *in vivo* con la esperanza de ser evaluados en los años próximos en estudios clínicos con humanos <sup>11</sup>.

En general, las propiedades antimicrobianas o biomédicas de las NP dependen de los métodos de síntesis y de las condiciones de formulación, como la naturaleza del agente reductor, el tiempo de reacción la temperatura, el pH, la concentración de iones metálicos, el tipo de solvente, la composición química final, así como su forma y tamaño. Con el objetivo de potenciar su actividad antimicrobiana y reducir su inmunogenicidad, las NP pueden ser recubiertas con diversos agentes. Por ejemplo, se pueden utilizar estabilizadores de superficie, tensoactivos, polímeros y oligonucleótidos. Estos agentes de recubrimiento también contribuyen a mantener estables las NP y evitar su aglomeración <sup>15</sup>.

Al igual que en la nanomedicina, se anticipa que la aplicación de la nanotecnología en odontología posibilitará el logro de una salud oral óptima a través del uso de nanomateriales y biotecnología. Esto incluye la aplicación de la ingeniería de tejidos y diversas tecnologías, como los nanorobots. Específicamente, enfermedades como la caries dental, la hipersensibilidad dental y el cáncer oral pueden ser diagnosticadas Con mayor profundidad mediante la evaluación cuantitativa de las propiedades morfológicas, biofísicas y bioquímicas a escala nanométrica tanto de la superficie dental en sí misma como de los materiales dentales o los fluidos orales como la saliva. La nanotecnología aporta una amplia gama de innovaciones y mejoras en la prevención, diagnóstico y tratamiento de afecciones bucales <sup>11</sup>.

En cuanto a las patologías oncológicas, las estrategias de diagnóstico a menudo son costosas, requieren más tiempo y no siempre tienen la capacidad de distinguir eficazmente entre tejido normal y tumoral, lo que puede retrasar el inicio del tratamiento. Las pruebas que se basan en el uso de la nanotecnología, en especial con el empleo de NP, han demostrado exitosamente una mejor precisión y sensibilidad en el diagnóstico de enfermedades. Por ejemplo, las NP pueden llevar consigo agentes de contraste útiles para la imagenología, así como fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica. Conjuntamente, ciertas clases de NP poseen propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas controladas de manera única para generar luz y calor en el diagnóstico y tratamiento del cáncer oral <sup>4</sup>.

### 1.3.1. Nanotecnología en el tratamiento oncológico

La técnica novedosa basada en nanotecnología ha generado expectativas prometedoras para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Las NP, que abarcan tanto las de origen orgánico (ej., liposomas, dendrímeros y polímeros PEGilados) como las inorgánicas (ej., NP magnéticas, puntos cuánticos y nanotubos de carbono), han sido ampliamente empleadas debido a su diminuto tamaño, alta reactividad y la posibilidad de ajustar sus funciones de manera personalizada <sup>4</sup>.

En la actualidad, es posible superar las limitaciones convencionales en diagnóstico y terapia mediante el uso de diversas NP, aprovechando las particularidades anatómicas y las condiciones fisiopatológicas del tumor, como la angiogénesis, la hipoxia, el pH bajo y el drenaje linfático ineficaz. Los vasos sanguíneos en el tumor son irregulares y altamente permeables por la alteración en sus uniones intercelulares. Esto permite que las macromoléculas, incluyendo las NP, se acumulen específicamente en el espacio intersticial del tumor sin ser eliminadas rápidamente <sup>4</sup>.

La mayoría de las NP diseñadas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer se basan en un enfoque pasivo, aprovechando estas condiciones particulares del microambiente tumoral para favorecer sus interacciones farmacocinética. Sin embargo, aún se requieren estrategias de direccionamiento activo más precisas y eficientes para lograr una disminución de la toxicidad sistémica y una entrega exitosa del fármaco. Una de estas estrategias es la unión de NP con ligandos o anticuerpos específicos para receptores y marcadores tumorales <sup>4,9</sup>.

La terapia con NP ofrece diversas variantes, como la utilización de nanovehículos para transportar medicamentos en su superficie o en el núcleo de las NP, permitiendo su liberación en el sitio tumoral. En este contexto, se ha reportado una considerable cantidad de investigaciones sobre la formulación a escala nano de fármacos en los últimos años. No obstante, solamente un reducido número de estos sistemas ha progresado hacia una evaluación orientada al mercado y una proporción aún menor ha obtenido la aprobación definitiva <sup>4,9</sup>.

Un ejemplo de esto es la aprobación para el uso de liposomas como vehículos para fármacos, gracias a la habilidad de los medicamentos hidrofílicos e hidrofóbicos para integrarse a sus lípidos anfipáticos. La mayor ventaja de las NP basadas en lípidos reside en su baja toxicidad en el organismo <sup>9</sup>. En contraparte, las nanopartículas de plata (AgNP) no han podido emplearse vastamente en terapias de administración de medicamentos debido principalmente a una carga insuficiente y a la toxicidad asociada con la plata <sup>13</sup>.

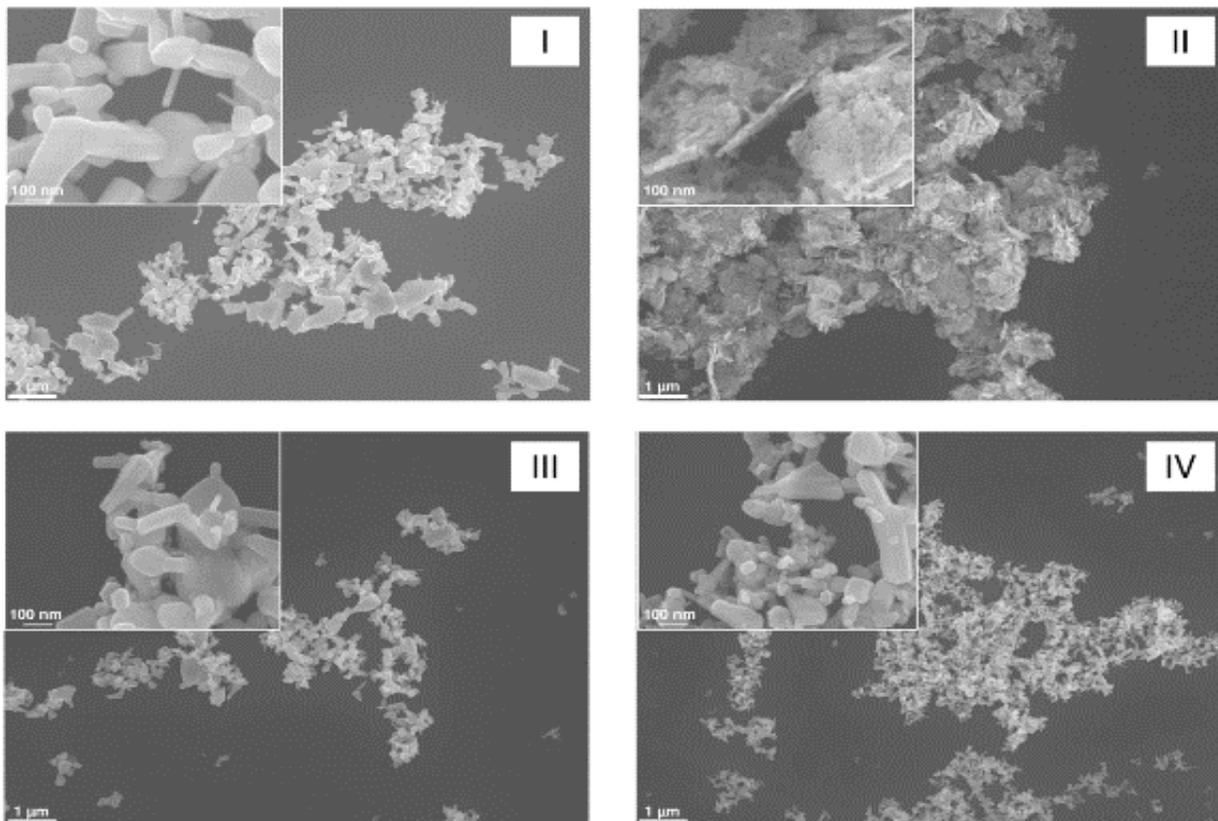
Sin embargo, con el propósito de aprovechar en la nanomedicina su eficaz capacidad de penetración a través de las membranas celulares, se han aplicado estrategias ecológicas para mejorar la estabilidad de las AgNP y reducir su toxicidad. Entre los métodos de síntesis verde está la utilización de extractos de hojas de neem y curry, que de manera exitosa ha permitido la fabricación de AgNP conjugadas a doxorubicina (DOX) para el tratamiento de cáncer de mama <sup>13</sup>. Además de las antraciclinas, los taxanos, y el 5-FU son otros fármacos antineoplásicos que se han conjugado con nanoacarreadores. De este último quimioterapéutico se ha estudiado su interacción y efectividad con múltiples nanomateriales, entre los que se incluyen liposomas, NP poliméricas, nanocompuestos de carbono y NP inorgánicas (ej., de platino y óxido de hierro) <sup>9</sup>. Por otro lado, las terapias dirigidas que involucran a las nanoenzimas hacen referencia al uso de nanomateriales con propiedades catalíticas similares a las de las enzimas biológicas. Las NP utilizadas para este fin presentan algunas cualidades distintivas en comparación con las enzimas naturales. En primer lugar por la posibilidad de emplearse como nanoacarreadores de fármacos, además de su efecto intrínseco como nanoenzima, y en segundo lugar por la actividad catalítica controlada, con mayor estabilidad y menor costo que estos nanomateriales proveen <sup>9,14</sup>.

Al aumentar la presencia de especies reactivas de oxígeno dentro de las células y mejorar la capacidad de los medicamentos para atravesar las membranas, las nanoenzimas tienen una acción directa contra las células cancerosas. Un caso ejemplar de esto es el impacto citotóxico de las NP de óxido de hierro, óxido de

cromo y óxido de níquel en la línea de células HepG2 de carcinoma hepatocelular, con un efecto mínimo en los macrófagos sanguíneos humanos <sup>(9)</sup>.

De forma similar, estudios celulares han revelado que las NP de óxido de magnesio (MgO) median la apoptosis mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno en las líneas celulares de cáncer K562, sin que esto haya demostrado efectos adversos en los linfocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) <sup>15</sup>. El incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno también es uno de los elementos que contribuyen al efecto citotóxico causado por los nanorods de oro (NP en forma capsular) <sup>16</sup>.

Además de las AuNP y AgNP, existe evidencia que respalda las propiedades antimicrobianas y anticancerígenas del óxido de zinc (ZnO) y óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), gracias a la generación de especies reactivas de oxígeno, degradación de los componentes celulares bacterianos, afectando la cadena de transporte de electrones y en la membrana celular bacteriana. Específicamente, las ZnONP (Figura 1) se consideran uno de los materiales dentales más avanzados, mostrando un efecto antibacteriano cuando entran en contacto con superficies de diversos materiales, así como cuando estas NP se incorporan en resinas compuestas <sup>17,18</sup>.



**Figura 1. Nanopartículas de óxido de zinc (ZnONP).** Imágenes obtenidas por microscopio electrónico con magnificación de 10,000x y 50,000x. Cada recuadro enumerado representa una muestra distinta de ZnONP, obtenidas de diversas fuentes. Esto demuestra la variación en la morfología entre cada agrupación.

Fuente: Tomado de Pham PV <sup>(19)</sup>

#### 1.4. Cultivos celulares y su clasificación

El cultivo celular, implica el crecimiento de células fuera del cuerpo en condiciones controladas, es un avance importante en biología celular de la aplicación de la biotecnología. En biomedicina, se emplean cultivos celulares animales, que pueden ser primarios (aislados de tejidos) o líneas celulares (cultivadas en condiciones controladas). Algunas líneas celulares, como la línea HeLa derivadas de células cancerosas, pueden dividirse indefinidamente en condiciones adecuadas <sup>19</sup>.

Los cultivos celulares pueden ser adherentes o en suspensión, y su eficacia mejora con los equipos y medios adecuados <sup>19</sup>. Los estudios de imagenología en células vivas actuales son técnicas emergentes que benefician al diagnóstico y terapia del

cáncer al investigar a profundidad el efecto de las NP y fármacos. Estos estudios permiten analizar y evaluar actividades celulares *in vivo* como la toxicidad, biodistribución, el paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE), mecanismos de captación celular, muerte, proliferación e inhibición celular en respuesta a exposición a NP <sup>20</sup>.

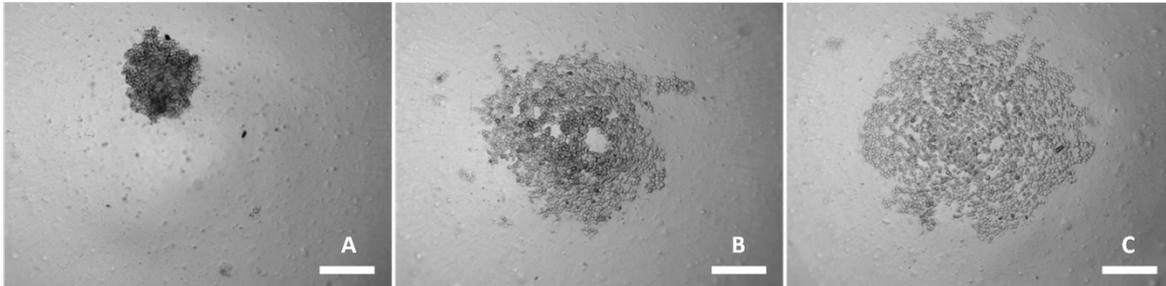
La utilización de cultivos celulares en nanomedicina presenta ciertas restricciones. La mayoría de los sistemas *in vitro* carecen del efecto inmunológico, proteínas sanguíneas, interacciones hormonales, entre otros componentes complejos del organismo. Esto dificulta la extrapolación de hallazgos basados en cultivos celulares de estudios de NP a modelos animales <sup>20</sup>.

#### 1.4.1. Cultivos celulares, cultivos 3D y sus aplicaciones

Si bien los cultivos celulares *in vitro* son útiles para comprender cómo se comportan las células *in vivo*, los sistemas de cultivo bidimensionales (2D) convencionales pueden proporcionar resultados que no reflejan completamente al organismo, ya que están ausentes las interacciones intercelulares y con la matriz extracelular (MEC) que estimulan la bioactivación de las células. Para esta discrepancia en el comportamiento celular entre los sistemas de cultivo celular *in vitro* y la fisiología celular *in vivo*, se han desarrollado nuevas plataformas de cultivo celular tridimensional (3D) diseñadas para simular de una forma más precisa las condiciones *in vivo* <sup>21</sup>.

Los modelos celulares 3D muestran un gran potencial en diversas áreas de investigación, incluyendo la nanotecnología. Estos modelos 3D ofrecen una plataforma para estudiar la nano-toxicidad en sistemas vivos, puesto que la formación de agrupaciones celulares influye en la capacidad de penetración de las NP y en el efecto citotóxico que puedan causar. Sin embargo, este campo aún no ha sido completamente explorado debido a la complejidad en la preparación de muestras y la implementación de modelos. En este mismo sentido, es importante destacar que no existe una sola tecnología en 3D aplicable para todas las investigaciones <sup>21</sup>.

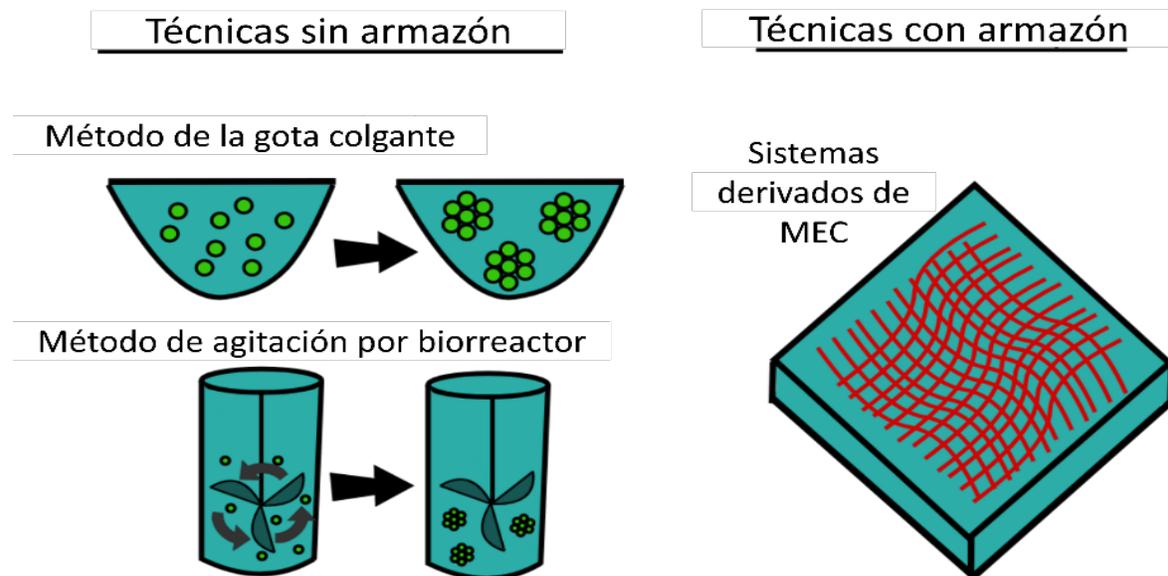
Se pueden clasificar en dos categorías principales los sistemas diseñados para realizar cultivos celulares 3D: los sistemas de cultivo sin armazón y sistemas basados en armazones (Figura 2).



**Figura 2. Sistemas para el cultivo celular tridimensional.** MEC: Matriz extracelular. Fuente: Declan Riordan, trabajo propio 2019.

- **Sistemas de cultivo celular en 3D sin armazones**

Para fomentar la autoagregación de células en esferoides (Figura 3) se puede optar por el uso de placas de baja adherencia para, el uso del método de la gota colgante o la utilización de biorreactores en condiciones dinámicas de cultivo <sup>21</sup>.



**Figura 3. Esferoides de la línea celular U251MG.** En cada recuadro se demuestra el estado de agregación de los esferoides a las 24 horas post-siembra e iniciado el tratamiento con lomustina. A: 62.5  $\mu\text{M}$ ; B: 125  $\mu\text{M}$ ; C: 250  $\mu\text{M}$ . Imágenes tomadas con microscopio de campo claro objetivo 10x, escala de 100  $\mu\text{M}$ . Fuente: Tomado de Darja.Lavogina, trabajo propio 2022.

Se ha mencionado que las condiciones ideales para la formación de esferoides surgen de un crecimiento clonal mediante la proliferación celular en lugar de la agregación celular. Pues los esferoides formados por agregación celular tienden a tener conexiones menos estables, así como dificultad conseguir un tamaño uniforme y composición estandarizada <sup>14</sup>.

La técnica de cultivo de organoides, por otro lado, implica la diferenciación de células troncales que replican el entorno tridimensional y las señales moleculares que normalmente se encontrarían en un organismo vivo. Estas células pueden obtenerse a través de un cultivo en monocapa sobre células alimentadoras o sobre una superficie revestida con una MEC, donde logran organizarse y desarrollarse en estructuras que se asemejan a un órgano o tejido específico <sup>21</sup>.

- **Sistemas de cultivo celular en 3D con armazones**

Los armazones, o andamios, se definen como estructuras tridimensionales fabricadas a partir de una variedad de materiales con distintas porosidades, permeabilidad, naturaleza de la superficie y estabilidad mecánica, con el fin de proveer una reconstrucción ideal del microentorno de tejidos específicos. A diferencia de los sistemas sin armazones, esta microarquitectura potencia la interacción biofísica y bioquímica de las células adheridas y proporciona una base biológicamente activa para la proliferación, diferenciación y organización celular <sup>21</sup>. Dos subcategorías se desprenden de este sistema, armazones sólidos y los hidrogeles. Sobre los primeros, estos armazones son estructuras tridimensionales con poros interconectados que permiten la infiltración de células y el crecimiento en el interior de la estructura. Pueden estar compuestos de materiales biodegradables o sintéticos. Los hidrogeles, por su parte, proporcionan un entorno tridimensional absorbente para el crecimiento celular y suelen estar compuestos de materiales naturales como colágeno, fibrina, o materiales sintéticos <sup>21</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

Actualmente, la investigación sobre la aplicación de NP en el tratamiento del cáncer oral tiene como objetivo descubrir nuevas maneras de mejorar significativamente la eficacia de los tratamientos, disminuir los efectos secundarios y proporcionar opciones terapéuticas más precisas y personalizadas para los pacientes que enfrentan esta enfermedad.

En cuanto a algunos hallazgos notables sobre el tratamiento del cáncer oral con NP, como se ha subrayado en el capítulo previo, los nanovehículos o nanocarreadores han demostrado ser prometedoras para contrarrestar los mecanismos de evasión de las células tumorales y en la mejora de las estrategias de tratamiento al disminuir las tasas de resistencia <sup>22</sup>. Según el reporte de Atashi et al., los porcentajes de resistencia al cisplatino y al 5-FU son del 33% y 40.2%, respectivamente. Vencer la resistencia a estos fármacos podría tener un impacto significativo en el pronóstico del cáncer oral en etapas avanzadas <sup>23</sup>. Biswal et al. buscaron enfoques distintos para vencer la resistencia al cisplatino en el cáncer oral, para lo cual utilizaron medicamentos encapsulados en NP, lo que supuso una mejora notable al tratarse de una terapia dirigida contra el cáncer oral <sup>24</sup>.

Dentro del área de estudio de las NP inorgánicas, mismas que cuentan con la cualidad de generar efectos citotóxicos, las MgONP se reconocen por sus usos como agente antibacteriano, para mitigar la acidez estomacal y promover la regeneración ósea. Sin embargo, su potencial de toxicidad hacia las células cancerosas aún no ha sido investigado por completo. Al presente, se ha documentado que las MgONP muestran una toxicidad hacia el sitio tumoral dependiente tanto de la dosis como del tiempo <sup>14,18</sup>.

Respecto a otra NP inorgánica utilizada con frecuencia, Singh et al. destacaron la falta de estudios sobre el uso de las ZnONP como nanocarreadores de fármacos antineoplásicos y la evaluación de su eficacia <sup>25</sup>. Ya que las ZnONP tienen baja toxicidad sistémica por su eliminación biodegradable, son excelentes opciones en potencia para ser nanovehículos de fármacos como DOX, PTX, y curcumina <sup>13</sup>. Con

la síntesis verde de NP magnéticas de ZnO, Sriramulu et al. demostraron una liberación del 95% del anticuerpo carfilzomib en 360 minutos (26).

Además de considerar los materiales utilizados en la síntesis de NP y la creación de nanovehículos para fármacos específicos, la planificación meticulosa de los insumos y métodos en proyectos de investigación es esencial para garantizar la validez de los resultados obtenidos. Por ello, definir el tipo de cultivo o el modelo animal con el que se evaluarán las NP, como las de ZnO y MgO, es crucial para garantizar la validez y relevancia de los resultados de investigación en etapas preclínicas <sup>14</sup>.

Notablemente, ha surgido un interés creciente en la transición de los cultivos celulares tradicionales en 2D a cultivos en 3D <sup>14</sup>. En algunos casos, las células cultivadas en 3D pueden demostrar una mayor sensibilidad al efecto de las NP en comparación con las monocapas de células en 2D, como se ha evidenciado en el caso de las ZnONP <sup>18</sup>. En otros casos, contrario a la hipótesis común, los modelos 2D pueden mostrar una mayor susceptibilidad a la citotoxicidad del ZnO en cualquier dosis, en comparación con el modelo 3D. Esto debido al efecto protector que pueden presentar ciertas líneas celulares en las capas externas de los modelos 3D frente a la citotoxicidad del ZnO <sup>27</sup>.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La terapia actual en el tratamiento de las neoplasias malignas en cabeza y cuello dependen del tamaño, tipo y localización del cáncer, el tratamiento usualmente consiste en cirugía, quimioterapia o radioterapia. En ocasiones se realizan terapias radicales quirúrgicas, que desencadenan una serie de efectos secundarios para los pacientes y requieren coadyuvantes a su terapia, por lo que las investigaciones sobre nuevas alternativas de tratamiento son de gran valor en la oncología médica. El estudio de la nanotecnología ha incrementado en los últimos años creando nuevas propuestas, dichas investigaciones se encuentran en curso y la mayoría enfocadas en cánceres de otras áreas, resaltando la importancia de investigaciones

enfocadas en cabeza y cuello, especialmente haciendo uso de cultivos tridimensionales y nanotecnología, con la finalidad de que puedan ser evaluados a futuro en estudios clínicos con humanos.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Las investigaciones de fármacos antineoplásicos se han realizado en placas bidimensionales que no siempre permiten la representación más real al entorno tumoral, durante esta fase experimental múltiples tratamientos muestran grandes resultados pero al momento de realizarlo en pacientes no se tiene el mismo éxito. Actualmente los cultivos tridimensionales (3D), gracias a una mezcla de células, matriz biológica y factores de crecimiento permiten ver el metabolismo tumoral, logrando distintas zonas del tumor secundarias al agotamiento de nutrientes y oxígeno.<sup>28</sup>

El uso de cultivos 3D apoya también a evitar más la experimentación en animales, ya que a pesar de que compartimos al menos un 85% de nuestros genes con los ratones que son los más utilizados, esto no garantiza no diferir significativamente entre sí por factores como el metabolismo, la anatomía y función de los órganos.<sup>29</sup> Sin restar importancia a la gran contribución moral en México por el reemplazo de las pruebas en animales por los cultivos 3D.

La propuesta actual en la generación de esferoides es tener una arquitectura 3D de las células tumorales in vitro simulando el microentorno multicelular y su respuesta a los agentes terapéuticos, adicionando el uso de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de magnesio.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Conocer el efecto antineoplásico del conjugado de nanopartículas de ZnO, MgO con 5-fluorouracilo en cultivo con esferoides de células neoplásicas de estirpe linfoide.

### 5.2 Objetivos específicos

- Determinar dosis citotóxicas medias de 5-fluorouracilo y nanopartículas de ZnO y MgO.
- Crear modelos 3D a partir de un cultivo de células neoplásicas.
- Comparar el efecto de la terapia antineoplásica del 5-fluorouracilo con nanopartículas ZnO y MgO en los modelos 3D.

## 6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de las nanopartículas y 5-fluorouracilo en esferoides de cultivo celular linfoide realizado en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León UNAM en el periodo de mayo a octubre del 2022 ?

## 7. HIPÓTESIS

**Hipótesis nula:** Las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de magnesio conjugado con 5-fluorouracilo no potencializarán ni mostraran ningún efecto antineoplásico en un modelo 3D de células neoplásicas.

**Hipótesis alternativa:** Las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de magnesio conjugado con 5-fluorouracilo potencializarán el efecto antineoplásico en un modelo 3D de células neoplásicas.

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1 Diseño metodológico

Diseño metodológico: Experimental puro, descriptivo, comparativo, prospectivo.

Ámbito de estudio

Universo: Explante de neoplasia linfoide.

Población: Células de cultivo celular linfoide

Muestra: Esferoides viables para análisis.

## 8.2 Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Naturaleza	Es- cala	Fun- ción
<b>Antineoplásicos</b>	Que impide la formación de neoplasias (crecimientos que se pueden volver cancerosos)	Dosis de medicamento medida en balanza analítica en mg	CC	R	I
<b>Nanopartículas</b>	Partícula que es más pequeña que 100 nanómetros(milmillonésima parte de un metro)	Dosis medida en balanza analítica en mg	CC	R	I
<b>Morfología del esferoide</b>	Descripción de la forma externa del esferoide	Que presenta morfología esférica en zonas específicas del esferoide	CP	O	I
<b>Diámetro del esferoide</b>	Longitud que cruza el centro de una figura esférica	Diámetro del esferoide expresado en $\mu\text{m}$	CD	In	I
<b>Viabilidad celular</b>	Cantidad de células sanas en una población para determinar la actividad enzimática, integridad de la membrana celular y producción de ATP.	Es el número de cantidad de células vivas medida a través del espectrofotómetro	CC	R	D
<b>Reacción de inmunohistoquímica</b>	Reacción inmunoenzimática a través de anticuerpos para detectar antígenos específicos en los tejidos	Observación de células inmunomarcadas a través de microscopia de luz	CD	N	D

I: Independiente, D: Dependiente, R: Razón, O: Ordinal, In: Intervalo, CC: Cualitativa continua, CP: Cualitativa politómica, CD: Cualitativa dicotómica, N: Nominal.

### 8.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

#### Criterios de inclusión:

- Formación de esferoides esféricos.
- Diámetro de 150 a 250  $\mu\text{m}$ .

#### Criterios de exclusión:

- Esferoides con pérdida celular.
- Esferoides con precipitados de nanopartículas.

#### Criterios eliminación:

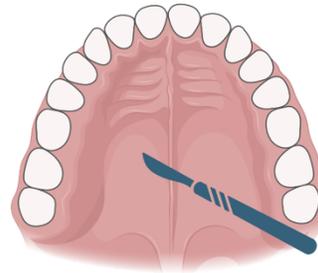
- Pérdida de esferoides durante el procesamiento histológico.
- Contaminación de muestras durante el procesamiento histológico.

### 8.4 Sustancias químicas y reactivos

Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, México, a menos que se indique lo contrario.

### 8.5 Muestra de biopsia de tejido

Se obtuvo una biopsia tumoral de 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 en dos mitades, la mitad se envió para estudio histopatológico (área de patología oral y maxilofacial) y la otra mitad para cultivo celular primario (área de nanoestructuras y biomateriales), ambas áreas son del Laboratorio de Investigaciones Interdisciplinarias de la Escuela Nacional de Estudios Superiores. (ENES) Unidad León, UNAM. El aislamiento de cultivos fue aprobado por el comité de bioética de la ENES Unidad León, UNAM con el código de registro CE\_16 004\_SN.

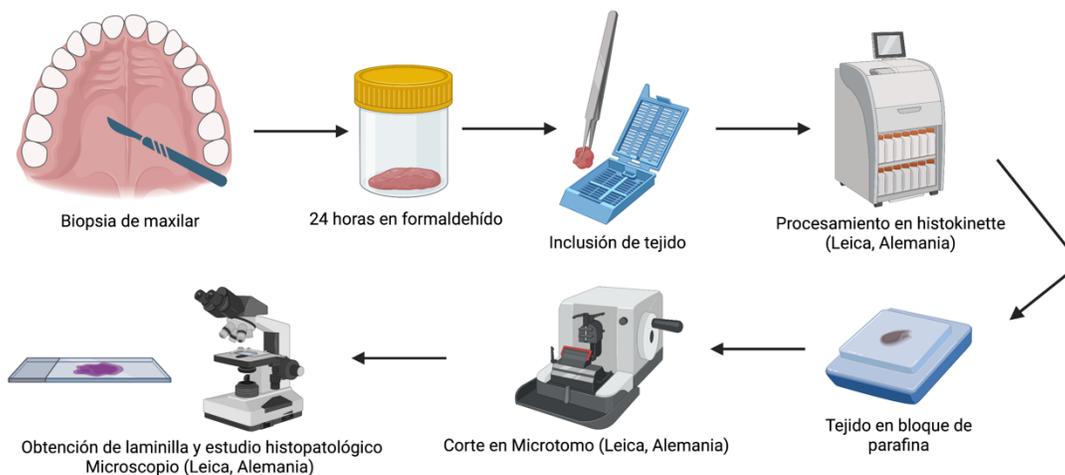


Biopsia de maxilar

**Figura 4. Muestra de biopsia del tejido.** Fuente: Propia (BioRender 2023)

### 8.6 Hallazgos histopatológicos

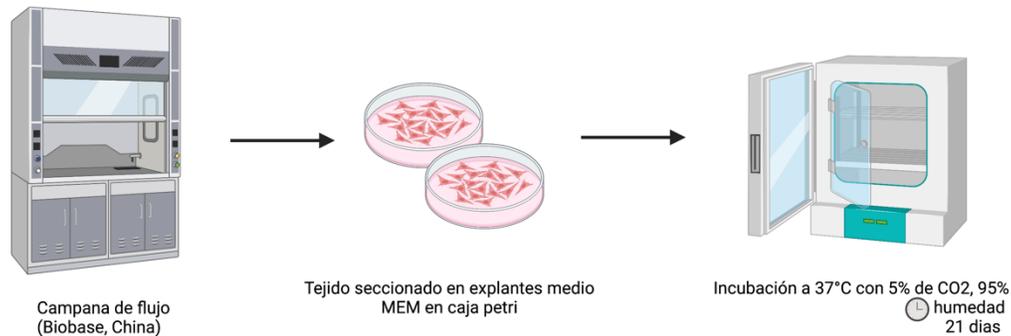
La biopsia de tejido se sumergió en formalina tamponada al 4 % durante un período de 24 horas, luego se trató con Histokinette pasando por series graduadas de alcohol 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 90 % y 100 %, Alcohol 100 %- Xilol, I y II, parafina I y II (Leica, Alemania), incluidos en parafina y luego cortados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



**Figura 5. Hallazgos histopatológicos.** Fuente: Propia (BioRender 2023)

### 8.7 Cultivo celular primario

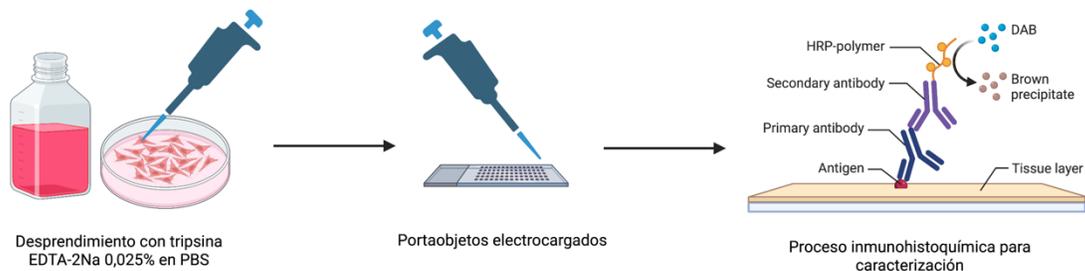
Todo el proceso se gestionó dentro de la campana de flujo laminar horizontal (Biobase, China). El tejido se seccionó en explantes de 1x1 mm y se incubó con medio mínimo esencial de águila (MEM, Sigma-Aldrich, MO, EE. % de antibiótico en cajas de Petri de 10 cm de diámetro e incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante 21 días.



**Figura 6. Cultivo celular primario.** Fuente: Propia (BioRender 2023)

### 8.8 Caracterización celular

Las células de cáncer linfoide 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.



**Figura 7. Caracterización celular.** Fuente: Propia (BioRender 2023)

### 8.9 Preparación de solución stock y nanocarreadores

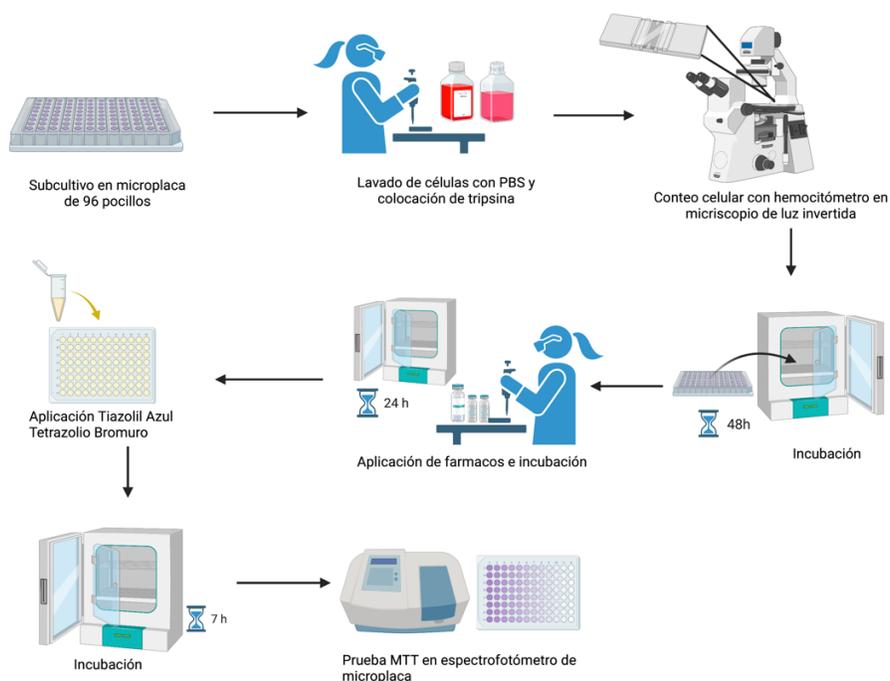
La solución madre se preparó de la siguiente manera: en el caso de 5-FU, se preparó una solución de 1 mol, para NP 1 mg/mL y finalmente para nanocarrier se consideró una proporción de 1:1 (5 mL) y se preparó el compuesto para los estudios posteriores. Todas las soluciones madre se dispersaron en agua destilada.



**Figura 8. Preparación de solución stock y nanocarreadores.** Fuente: Propia (BioRender 2023)

### 8.10 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  $1 \times 10^5$  células/mL durante 48 horas y permitió la unión completa. Posteriormente las células se incubaron con los diferentes fármacos libres (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, ( $\leq 50$ nm), 2) ZnONPs ( $\leq 50$ nm), 3) 5-FU, 4) 5-FU+MgONPs, 5) 5-FU+ZnONPs, durante 24 horas en medio de cultivo fresco. La viabilidad celular se evaluó mediante el método MTT, en el que las células se incubaron con bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo durante 7 horas y se midió la absorbancia a 570 nm mediante un lector de espectrofotómetro de microplacas (Thermo-scientific, Helsinki, Finlandia). La citotoxicidad se evaluó según la norma ISO 10993-5:2009 y se calculó la concentración citotóxica al 50% (CC50) para cada grupo.



**Figura 9. Estudio de dosis-respuesta usando cultivo celular 2D.** Fuente: Propia (BioRender 2023)

### 8.11 Formación de esferoides y estudio dosis-respuesta

Los esferoides se formaron utilizando un método de superposición líquida con agarosa al 1,5% (Sigma-Aldrich, San Louis, EE. UU.). La solución de agarosa se preparó esterilizando en autoclave la solución durante 15 minutos y se añadieron 50  $\mu$ l a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, que 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. Los esferoides se trataron con los compuestos similares mencionados anteriormente, a su dosis CC50 para cada grupo (n=9). Posteriormente se evaluaron los esferoides para: 1) MTT= bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazolio, directamente en las placas y 2) los esferoides recolectados se centrifugaron durante 20 minutos a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se fijaron con formalina tamponada al 4%, luego se procesaron con técnicas de tinción H&E e inmunohistoquímica.

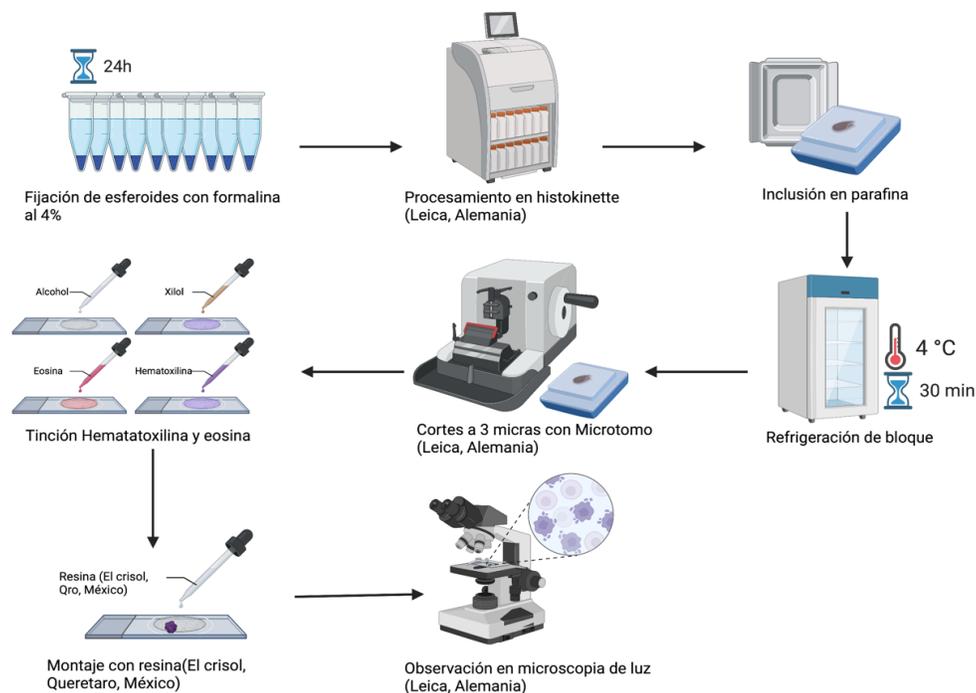


**Figura 10. Formación de esferoides y estudio dosis-respuesta.** Fuente: Propia (BioRender 2023)

### 8.12 Proceso de inmunohistoquímica y tinción H&E

Todos los esferoides se incubaron con formalina tamponada al 4 % durante 24 h, Histokinette envuelta en papel de filtro y 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), incluido en parafina y refrigerado a 4°C durante 30 min y procesado con micrótopo y luego cortado en secciones de 3 micras usando un micrótopo (Leica , Alemania). Las secciones se suspendieron en una bañera, se fijaron en un portaobjetos de vidrio y se dejaron en una placa caliente durante 24 horas. Posteriormente, se someten a un tren de tinción mediante xilol al 100% durante 20 minutos, alcohol al 100% durante 30 segundos, alcohol al 96% durante 30 segundos, hematoxilina durante 10 minutos, carbonato de litio durante 15 segundos, eosina durante 10 minutos, alcohol durante 96 % 10 segundos, 100% alcohol 10 segundos y 100% xilol durante 20 minutos. Finalmente, se montaron con resina (El crisol, México, Querétaro) y cubreobjetos para observación al microscopio óptico a 40X (Leica, Alemania). En el caso de la inmunohistoquímica, una vez obtenido el cubo de parafina, se corta con un micrótopo de 5 micras y se deja flotar en una tina con agua destilada a una temperatura de 40°C, se pesca con un portaobjetos con cola enzimática, se deja secar a 60°C por 30 min y se aplica el inmunomarcador ciclina D1.



**Figura 11. Proceso de inmunohistoquímica y tinción H&E.** Fuente: Propia (BioRender 2023)

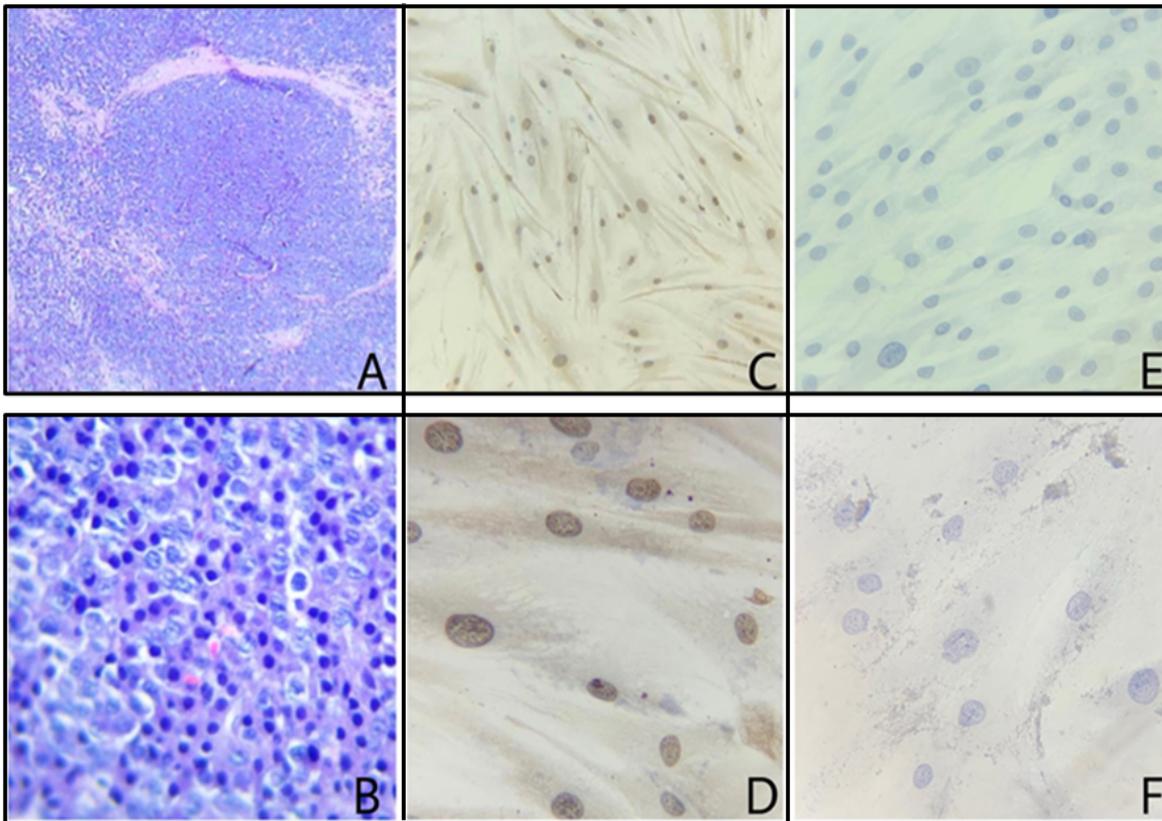
### 8.13 Análisis estadístico

El conjunto de datos incluye la media, el porcentaje y la desviación estándar para un tamaño de muestra de  $n=9$ , cuya normalidad se probó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se sometió a la prueba ANOVA post-hoc de Tukey en el software SPSS V16 (Statistical Package for Social Science, Chicago, EE.UU.). Se utilizó un nivel de significancia de  $p\text{-value}<0,05$  y un nivel de confianza del 95%.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Hallazgos histopatológicos y cultivo celular primario

La figura 12, A y B exhiben características para un diagnóstico de una neoplasia hematolinfoide constituida por dos tipos principales de células plasmáticas pleomorfas y células grandes núcleo central, escaso citoplasma, halo citoplasmático claro, con formación de centros germinales aislados, lo que da la apariencia de células linfoblásticas, exámenes posteriores sugieren marcadores específicos que apoyen el diagnóstico morfológico. Las células cercanas a la confluencia (90%, 4 PDL) se cultivaron durante 48 h, las microfotografías Vista C a 20X y Vista D a 40X mostraron ciclina D1 positiva fuerte (+++) y Vista E a 20X y Vista F a 40X negativa a CD3 (-), respectivamente. H&E= Hematoxilina y eosina, PDL= Nivel de duplicación de la población.



**Figura 12. Hallazgos histopatológicos y cultivo celular primario.** Hallazgos histopatológicos y caracterización de células de neoplasia maligna de estirpe linfoide. Microfotografía Vista A a 4X y vista B a 40X, representa la tinción H&E de la biopsia incisional. Las letras C y D mostraron la confirmación de células neoplásicas de estirpe linfoide por la fuerte expresión positiva de ciclina D1, mientras que CD3 fue negativo.

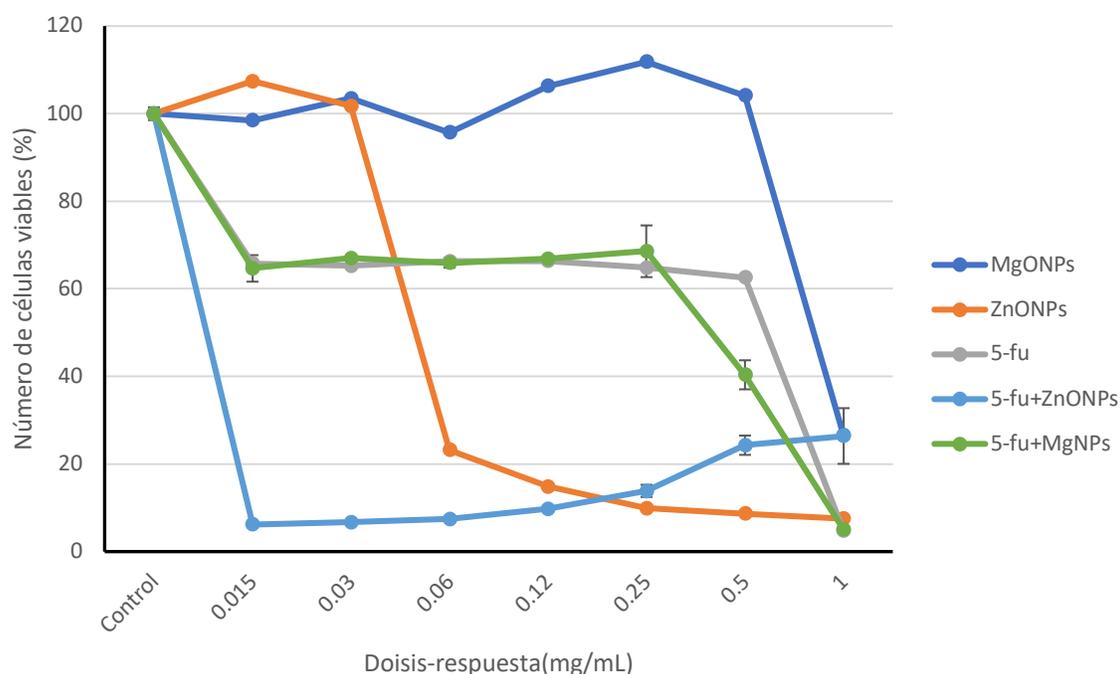
### 9.2 Compuestos y nanoportadores dosis-respuesta

Se incubaron células de cáncer hematolinfoide casi confluentes (90% de confluencia, 5 PDL) durante 24 h. Las células fueron tratadas en dosis-respuesta de 0-1 mg/mL con los diferentes antineoplásicos y nanocarreadores 5-fu+ZnONPs, 5-fu+MgONPs, 5-fu, , ZnONPs durante 24 horas. Después de la incubación, se determinó el número relativo de células viables mediante ensayo MTT. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de ensayos por triplicado (n=9), \*p<0,05, \*\*p<0,01 ANOVA Post-hoc Tukey test, absorbancias de 570 nm. PDL= Nivel de duplicación de la población; 5-fu= 5-fluorouracilo; ZnONPs= Nanopartículas de óxido de zinc;

MgONPs= nanopartículas de óxido de magnesio; DE= Desviación estándar. El tratamiento del esferoide para los diferentes compuestos y nanotransportadores ( Figura 13) y (Tabla 3). Las células fueron sensibles a los diferentes tratamientos, desde el más ( $p < 0.05$ ) hasta el menos sensible fueron los siguientes: 5-fu+ZnONPs < 5-fu+MgONPs < 5-fu < ZnONPs.

Grupos	CC50
MgO	0.65
ZnO	0.04
5-Fu	0.89
5-Fu+MgO	0.44
5-Fu+ZnO	0.01

**Tabla 3. Compuestos y nanoportadores dosis-respuesta.** Viabilidad celular con dosis/respuesta en cultivo 2D Fuente propia, realizado en Excel.

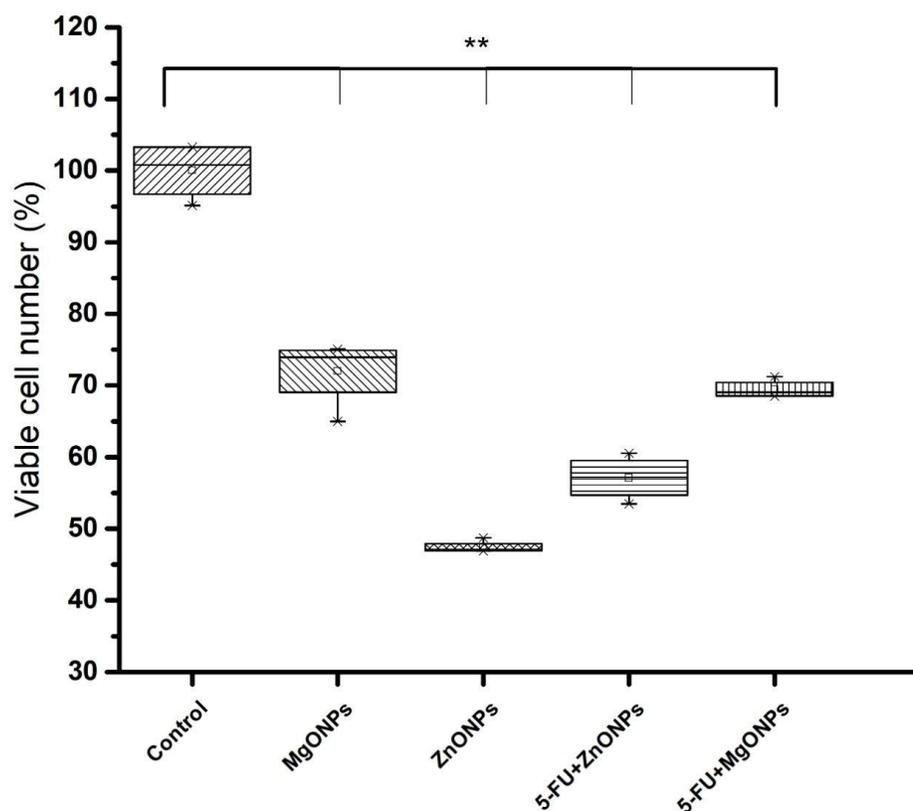


**Figura 13. Compuestos y nanocarriers dosis-respuesta.** Cada valor representa la media  $\pm$  DE de ensayos por triplicado (n=9), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  ANOVA Post-hoc

Tukey test, absorbancias de 570 nm. PDL= Nivel de duplicación de la población; 5-fu= 5-fluorouracilo; ZnONPs= Nanopartículas de óxido de zinc; MgONPs= nanopartículas de óxido de magnesio; DE= Desviación estándar.

### 9.3 Aplicación de compuestos y nanocarreadores a los esferoideos

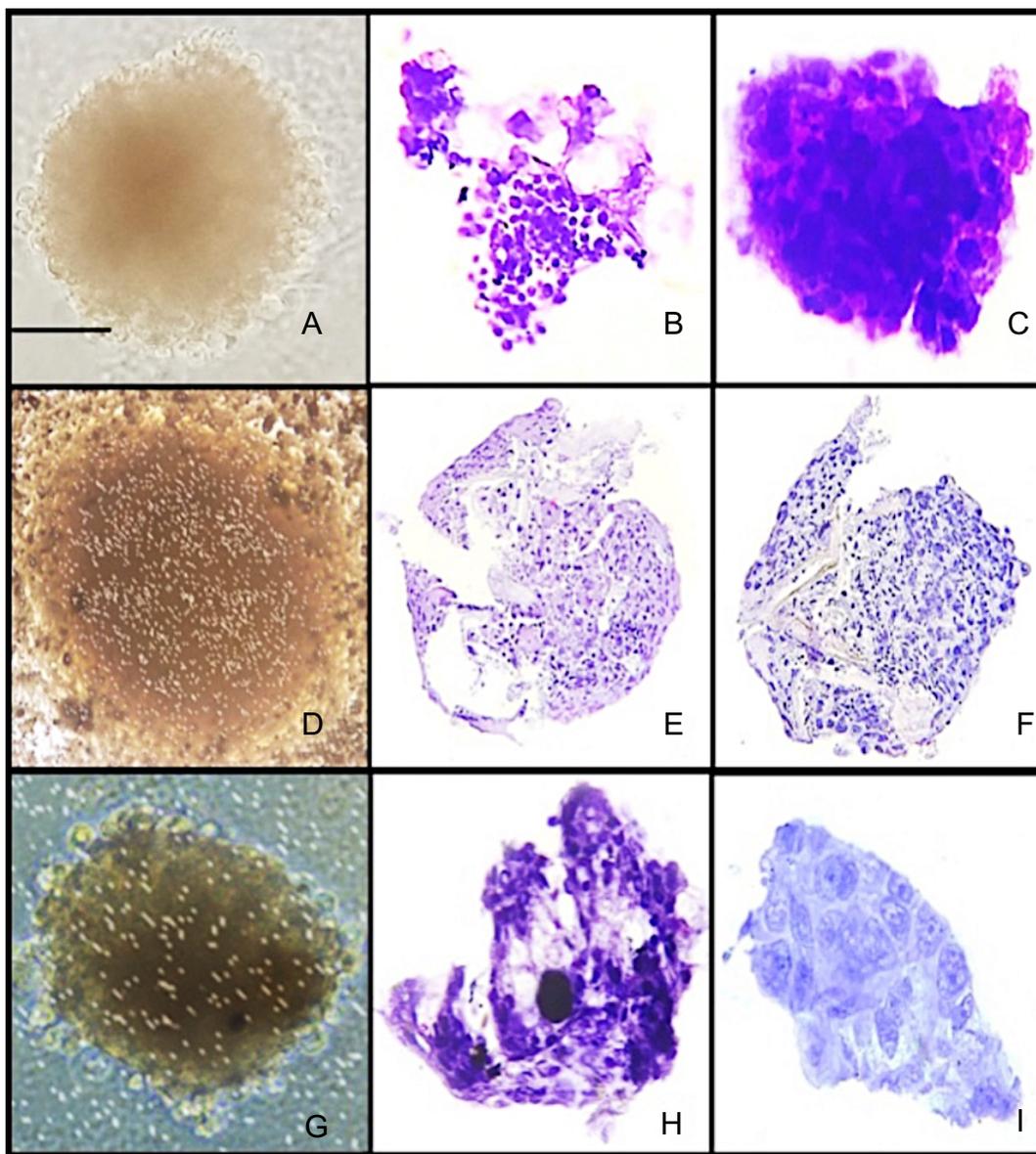
Los esferoideos se cultivaron durante 4 días para lograr una forma redonda. Luego, los esferoideos se trataron con dosis de CC50 de los diferentes grupos 5-fu+ZnONPs, 5-fu+MgONPs, 5-fu, ZnONPs, durante 24 horas. Después de la incubación, se determinó el número relativo de células de supervivencia viable mediante ensayo MTT. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de ensayos por triplicado (n=9), \*p<0,05, \*\*p<0,01 ANOVA Post-hoc Tukey test, absorbancias de 570 nm. El resultado fue 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=  $47.4\pm 0.8\%$  < 5-fu=  $57\pm 3,1\%$  < MgONPs=  $71,9\pm 4,7\%$  < 5-fu=  $84,5\pm 3,8\%$  < Control=  $100\pm 3,9\%$ . 5-fu= 5-fluorouracilo; ZnONPs= Nanopartículas de óxido de zinc; MgONPs= nanopartículas de óxido de magnesio. La prueba de MTT se realizó en los esferoideos tratados con nanoportadores y antineoplásicos, que mostraron una disminución de la población celular en el siguiente orden: ZnONPs =  $47,4\pm 0,8\%$  < 5-fu=  $57\pm 3,1\%$  < MgONPs=  $71,9\pm 4,7\%$  < 5-fu=  $84,5\pm 3,8\%$  < Control=  $100\pm 3,9\%$ . (Figura 14)



**Figura 14. Aplicación de compuestos y nanocarreadores a los esferoides.** El resultado fue 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=  $47.4 \pm 0.8\%$  < 5-fu=  $57 \pm 3.1\%$  < MgONPs=  $71.9 \pm 4.7\%$  < 5-fu=  $84.5 \pm 3.8\%$  < Control=  $100 \pm 3.9\%$ . 5-fu= 5-fluorouracilo; ZnONPs= Nanopartículas de óxido de zinc; MgONPs= nanopartículas de óxido de magnesio.

De igual manera, se tiñeron con H&E donde se apreció la reducción de núcleos dentro del esferoide, así como la pérdida de conformación esférica. La imagen A muestra el crecimiento esferoide mostrado por un compacto de forma redonda a los 4 días con un tamaño medio de  $150 \pm 25 \mu\text{m}$  bajo microscopía de luz. La tinción con H&E de esferoides en la Figura 15 B-C valida la existencia de núcleos dentro de los esferoides celulares el día 4. Los núcleos están densamente empaquetados en la región interna y algo aplanados en la periferia de los esferoides. Con el tiempo, las celdas de todos los esferoides se alinean para reducir la energía configuracional,

como se anticipó y se informó anteriormente. Las letras D,E y F muestran esferoides con la aplicación ZnONPs, G, H y I muestran esferoides con la aplicación 5-FU. Ver a 40X. Posteriormente se les realizó inmunohistoquímica con inmunomarcador Ciclina D1 donde se aprecia escaso marcaje de núcleos positivos. (Figura 15)



**Figura 15.** Letras A, D, G, vista de microscopía de luz; letras B, E, H, teñidas con H&E y C, F, I, inmunomarcadas con ciclina D1.

## 10. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se elaboraron esferoides a partir de un cultivo celular de una neoplasia de cabeza y cuello, al igual que Saraiva et al. Se realizaron a través de la técnica de superposición líquida, y a pesar de que la mayoría utilice modelos basados en andamios, coincidimos en que esta es una técnica simple y menos costosa, que permite una buena conformación del esferoide. Saraiva et al. mencionan también un punto importante de los modelos 3D que permiten utilizar material obtenido del paciente para realizar pruebas en vivo, y si bien, ellos utilizaron una línea celular de cáncer de mama y células inmunes derivadas del paciente, en nuestro caso células tumorales de la paciente, antineoplásicos y nanopartículas, la investigación del autor nos hace considerar la inmunoterapia en tumores que pueden presentarse en cabeza y cuello, con la posibilidad de un tratamiento más personalizado.<sup>30</sup>

Manisekaran et al, realizaron una revisión de la literatura donde se destaca el uso de las nanopartículas y su aplicación con otras nanoestructuras como agentes antineoplásicos, abriendo un nuevo escenario para el uso de la nanomedicina.<sup>31</sup>

Así como, Ghosh realizó un artículo donde incluyó los usos de un antineoplásico conjugado con nanomateriales, entre los que destacan el carbono, el oro y otras NP inorgánicas como la sílice y el óxido de hierro, destacando que uno de los principales objetivos es que las células tengan un nano-entrega del fármaco por endocitosis.<sup>32</sup>

En su revisión, Abhishek et al. Exploró el potencial anticancerígeno de las NP de ZnO, enfatizando su eficacia en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el cáncer de cuello uterino, de mama, de pulmón y de cabeza y cuello. Sin embargo, su revisión notó una escasez de estudios sobre la aplicación de NP de ZnO en neoplasias de estirpe hematológico. Cabe resaltar que en nuestra investigación las NP de ZnO tuvieron buen efecto antineoplásico incluso individualmente lo cual marca un antecedente importante.<sup>33</sup>

Atashi et al. realizó un estudio comparando 5-fluorouracilo y cisplatino, donde el 5-fluorouracilo solo tuvo una mayor frecuencia de resistencia en comparación con el cisplatino solo, lo que no concuerda con nuestro estudio, donde los esferoides tratados con cisplatino solo fueron los que menos respondieron al tratamiento. Del mismo modo, estos autores coinciden en que las terapias combinadas con otros fármacos serían más efectivas, lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio donde las NP conjugadas con cisplatino fueron más efectivas, y sin duda los resultados de cada una de las investigaciones nos invitan a continuar buscando nuevas terapias con la ventaja de realizarlas en modelos 3D.<sup>34</sup>

## 11. CONCLUSIÓN

La incidencia mundial del cáncer de cabeza y cuello ha aumentado considerablemente en los últimos años y se prevé continúe en aumento. Las tasas de supervivencia a 5 años de un 50% y en algunos casos menor ya que varían de acuerdo a la ubicación, sitio del tumor y estadio en el momento del diagnóstico. Dicha situación despierta mayor interés a dar seguimiento y abrir nuevas investigaciones relacionadas con el diagnóstico y tratamiento de cáncer.

En la presente investigación se crearon esferoides a través de andamios de un cultivo celular a partir de una lesión ubicada en cabeza y cuello, con la finalidad de estudiar la respuesta citotóxica de un antineoplásico y NPs, del conjugado de estas, así como de su respuesta individual, destacando el efecto de las NPs de ZnO y como nanocarreador del 5-FU, siendo un resultado prometedor, ya que existen varios informes sobre la capacidad de las nanopartículas inorgánicas como nanoportadores contra actividad anticancerígena, seguir estas líneas de investigación es novedoso para el futuro de la nanomedicina, especialmente de la enfocada a cabeza y cuello, ya que es un área de gran oportunidad para estudiar y trabajar en busca de nuevas alternativas que aporten un cambio significativo en la terapia del cáncer logrando una medicina personalizada y con mayor control en comparación a las terapias convencionales.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ¿Qué es el cáncer? [Internet]. Instituto Nacional del Cáncer. 1980 [citado el 18 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
2. Das SS, Bharadwaj P, Bilal M, Barani M, Rahdar A, Taboada P, et al. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for drug delivery, imaging, and theragnosis. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2020;12(6):1397. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/polym12061397>
3. Shams F, Golchin A, Azari A, Mohammadi Amirabad L, Zarein F, Khosravi A, et al. Nanotechnology-based products for cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2022;49(2):1389–412. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06876-y>
4. Zheng W, Zhou Q, Yuan C. Nanoparticles for Oral Cancer Diagnosis and Therapy. *Bioinorg Chem Appl*. 2021;2021. doi: 10.1155/2021/9977131. PubMed PMID: 33981334.
5. Gormley M, Creaney G, Schache A, Ingarfield K, Conway DI. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J* [Internet]. 2022;233(9):780–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41415-022-5166-x>
6. Carlson ER. Hematolymphoid Tumors of the Head and Neck. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;75(7):1319–21. doi: 10.1016/j.joms.2017.03.053.
7. Ferry JA. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Hematolymphoid Proliferations and Neoplasia. *Head Neck Pathol*. 2022;16(1):101–9. doi: 10.1007/s12105-022-01411-2. PubMed PMID: 35312979. Publicación electrónica 21 mar. 2022.

8. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J.* 2018;63 Suppl 1:S91-S99. doi: 10.1111/adj.12594. PubMed PMID: 29574808.
9. Valencia-Lazcano AA, Hassan D, Pourmadadi M, Shamsabadipour A, Behzadmehr R, Rahdar A, et al. 5-Fluorouracil nano-delivery systems as a cutting-edge for cancer therapy. *Eur J Med Chem.* 2023;246:114995. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114995. PubMed PMID: 36493619. Publicación electrónica 1 dic. 2022.
10. Gharat SA, Momin M, Bhavsar C. Oral Squamous Cell Carcinoma: Current Treatment Strategies and Nanotechnology-Based Approaches for Prevention and Therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2016;33(4):363–400. doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016016272. PubMed PMID: 27910740.
11. Poonia M, Ramalingam K, Goyal S, Sidhu SK. Nanotechnology in oral cancer: A comprehensive review. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2017;21(3):407–14. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_29\_17. PubMed PMID: 29391716.
12. Mba IE, Nweze EI. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(6):108. doi: 10.1007/s11274-021-03070-x. PubMed PMID: 34046779. Publicación electrónica 28 may. 2021.
13. Kesharwani P, Ma R, Sang L, Fatima M, Sheikh A, Abourehab MAS, et al. Gold nanoparticles and gold nanorods in the landscape of cancer therapy. *Mol Cancer.* 2023;22(1):98. doi: 10.1186/s12943-023-01798-8. PubMed PMID: 37344887. Publicación electrónica 21 jun. 2023.
14. Mendoza-Martinez NL, Cadena-Galeana AD, Villanueva-Sanchez FG, Perez-Cornejo N, Avelar-Juarez KM, Ramos-Baena JD, et al. Efficacy of Antineoplastic Nanocarriers on 3D Oral Cancer Spheroids. *In Vivo.* 2023;37(4):1658–65. doi: 10.21873/invivo.13251. PubMed PMID: 37369492.
15. Behzadi E, Sarsharzadeh R, Nouri M, Attar F, Akhtari K, Shahpasand K, et al. Albumin binding and anticancer effect of magnesium oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:257–70. doi: 10.2147/IJN.S186428. PubMed PMID: 30643405. Publicación electrónica 27 dic. 2018.

16. Kesharwani P, Ma R, Sang L, Fatima M, Sheikh A, Abourehab MAS, et al. Gold nanoparticles and gold nanorods in the landscape of cancer therapy. *Mol Cancer*. 2023;22(1):98. doi: 10.1186/s12943-023-01798-8. PubMed PMID: 37344887. Publicación electrónica 21 jun. 2023.
17. Souza Rastelli AN de, Carreira ET, Dias HB, Hamblin MR. Nanobiomaterials in dentistry. En: Mihai-Grumezescu A, editor. *Nanobiomaterials in Dentistry*: Elsevier; 2016. p. 1–25.
18. Krishnamoorthy K, Moon JY, Hyun HB, Cho SK, Kim S-J. Mechanistic investigation on the toxicity of MgO nanoparticles toward cancer cells. *J. Mater. Chem*. 2012;22(47):24610. doi: 10.1039/C2JM35087D.
19. Pham PV. *Medical Biotechnology*. En: *Omics Technologies and Bio-Engineering*: Elsevier; 2018. p. 449–69.
20. Kura AU, Fakurazi S, Hussein MZ, Arulselvan P. Nanotechnology in drug delivery: the need for more cell culture based studies in screening. *Chem Cent J*. 2014;8:46. doi: 10.1186/1752-153X-8-46. PubMed PMID: 25057288. Publicación electrónica 16 jul. 2014.
21. Saydé T, El Hamoui O, Alies B, Gaudin K, Lespes G, Battu S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(2).
22. Al-Mansoori L, Elsinga P, Goda SK. Bio-vehicles of cytotoxic drugs for delivery to tumor specific targets for cancer precision therapy. *Biomed Pharmacother*. 2021;144:112260. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112260. PubMed PMID: 34607105. Publicación electrónica 1 oct. 2021.
23. Atashi F, Vahed N, Emamverdizadeh 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):219–25. doi: 10.34172/joddd.2021.036. PubMed PMID: 34712414. Publicación electrónica 25 ago. 2021.
24. Biswal S, Panda M, Sahoo RK, Tripathi SK, Biswal BK. Tumour microenvironment and aberrant signaling pathways in cisplatin resistance and strategies to overcome in oral cancer. *Arch Oral Biol*. 2023;151:105697. doi:

- 10.1016/j.archoralbio.2023.105697. PubMed PMID: 37079976. Publicación electrónica 13 abr. 2023.
25. Singh TA, Das J, Sil PC. Zinc oxide nanoparticles: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;286:102317. doi: 10.1016/j.cis.2020.102317. PubMed PMID: 33212389. Publicación electrónica 9 nov. 2020.
26. Sriramulu M, Shukla D, Sumathi S. Aegle marmelos leaves extract mediated synthesis of zinc ferrite: Antibacterial activity and drug delivery. *Mater. Res. Express.* 2018;5(11):115404. doi: 10.1088/2053-1591/aadd88.
27. Chia SL, Tay CY, Setyawati MI, Leong DT. Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles. *Small.* 2015;11(6):702–12. doi: 10.1002/smll.201401915. PubMed PMID: 25331163. Publicación electrónica 20 oct. 2014.
28. Why mouse matters [Internet]. Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/10001345/importance-of-mouse-genome>
29. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature.* 2014;515(7527):355–64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13992>
30. 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.* 2020; 10: 1543. DOI: 10.3389/fonc.2020.01543.
31. Manisekaran R et al. State-of-the-art:MXene structures in nano-oncology. *Biomaterials Advances* 147 (2023).
32. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* 2019.

33. 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.
34. 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.

### 13. ANEXOS.






**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Odontología**  
**Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología, A. C.**

  
XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano de Investigación en Odontología

**Otorgan el presente**

## RECONOCIMIENTO

**A** **AYLIN DIVINA CADENA GALEANA, RAVICHANDRA MANISEKARAN MANISEKARAN, NANCY LETICIA MENDOZA MARTÍNEZ, NANCY PÉREZ CORNEJO, FRANCISCO GERMÁN VILLANUEVA SÁNCHEZ, RENÉ GARCÍA CONTRERAS**

Categoría: BÁSICA , Nivel: ESPECIALIDAD  
 Por su participación académica con la presentación en cartel  
**EFICACIA DEL USO DE NANOACARREADORES EN CULTIVO CON ESFEROIDES DE CÁNCER ORAL**

en el marco del  
**XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano de Investigación en Odontología**  
 efectuado los días 9 • 10 y 11 de noviembre de 2022.

Folio 42109112253

**“Por mi raza hablará el espíritu”**  
 Ciudad Universitaria, 11 de noviembre de 2022.

  
**Dr. Francisco Javier Marichi Rodríguez**  
 Director  
 Facultad de Odontología, UNAM

  
**Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén**  
 Presidente de la Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología, A.C.

Participación en el XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano de Investigación en Odontología.



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

La Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León  
a través de la División de Educación Continua e Innovación

Otorga el presente

# RECONOCIMIENTO

a

Nancy Leticia Mendoza-Martínez, Aylin Divina Cadena-Galeana, Ravi-  
chandran Manisekaran, Nancy Pérez-Cornejo,  
& Germán Villanueva-Sánchez, René García-Contreras

Por haber obtenido el  
**Tercer Lugar**  
en el Concurso de Presentaciones Orales  
con el trabajo  
**"Eficacia del uso de antineoplásicos y nanopartículas en  
cultivo 3D de línea linfoblástica"**  
en el marco del  
*1º Congreso Internacional de BioNano Materiales*

"Por mi Raza Hablará el Espíritu"  
León, Guanajuato, a 21 de octubre de 2022

Dra. Laura Susana Acosta Torres  
Directora  
ENES Unidad León, UNAM

Esp. Roberto Ruiz Díaz  
Jefe de División  
Educación Continua e Innovación

ENESL-UNAM-DECI-HICBN22-004

Participación en el 1er Congreso Internacional de Bionanomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM.

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

## **Efficacy of Antineoplastic Nanocarriers on 3D Oral Cancer Spheroids**

NANCY LETICIA MENDOZA-MARTINEZ<sup>1\*</sup>, AYLIN DIVINA CADENA-GALEANA<sup>1\*</sup>,  
FRANCISCO GERMAN VILLANUEVA-SANCHEZ<sup>1</sup>, NANCY PEREZ-CORNEJO<sup>1</sup>,  
KARLA MAYELA AVELAR-JUAREZ<sup>1</sup>, JOSE DAVID RAMOS-BAENA<sup>1</sup>,  
EDUARDO ALONSO CRUZ-MONROY<sup>1</sup>, ULISES VAZQUEZ-ZUNIGA<sup>1</sup> and RENE GARCIA-CONTRERAS<sup>2</sup>

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

Publicación de artículo "EFFICACY OF THE USE OF NANOCARRIERS IN ORAL  
CANCER SPHEROIDS"